

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: BBI



Sylvie Hejdánková

Interakce „symbiotických“ či „parazitických“ bakterií
Cardinium a *Wolbachia* s roztoči (Acari)

Interactions „symbiotic“ or „parasitic“ bacteria
Cardinium and *Wolbachia* with mites (Acari)

Bakalářská práce

Školitel: Mgr. Jan Hubert, Ph.D.

Praha, 2014

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval/a samostatně a že jsem uvedl/a všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 15.5.2014

Podpis

Ráda bych poděkovala svému školiteli Mgr. Janu Hubertovi, Ph.D. za věcné připomínky, trpělivost a vstřícnost při zpracování této práce.

Abstrakt

Tato práce shrnuje literární údaje o interakcích bakterií *Candidatus Cardinium hertigii* (Sphingobacteriales: Flexibacteraceae) a *Wolbachia pipientis* (Rickettsiales: Rickettsiaceae) s roztoči (Acari). Tyto bakterie jsou označovány za symbionty či reprodukční parazity a nacházejí se v mnoha druzích členovců. V této práci jsou revidovány poznatky charakterizující tyto bakterie, popisující morfologii a lokalizaci v těle hostitele a interakce obou bakterií s roztoči. Dosud známé interakce zahrnují ovlivnění roztočů vedoucí k cytoplazmatické inkompatibilitě, partenogenezi, feminizaci a selhání hybridů (hybrid breakdown). Do práce jsou rovněž zahrnuty dvojité infekce těmito bakteriemi, kdy jsou roztoči napadeni jak bakterií *Cardinium* tak *Wolbachia*, a násobné infekce, kdy jsou roztoči nakaženi několika liniemi zmíněných bakterií. Tyto bakterie mají poteniconální uplatnění v kontrole škodlivých roztočů nebo jako vhodné modelové případy pro studium interakcí členovce symbiotická/parazitická bakterie.

Klíčová slova: *Cardinium*, *Wolbachia*, roztoči, Acari, reprodukční parazit, cytoplazmatická inkompatibilita

Abstract

The thesis reviews known information and findings describing the interactions of bacteria *Candidatus Cardinium hertigii* (Sphingobacteriales: Flexibacteraceae) and *Wolbachia pipientis* (Rickettsiales: Rickettsiaceae) with mites (Acari). Both bacteria are known as symbionts or reproductive parasites and has been found in many species of arthropods. Here, the morphological characterization and localization of bacteria in their hosts and ecological interactions are revised and described. The main known interactions between these bacteria and mites lead to cytoplasmic incompatibility, parthenogenesis, feminization and hybrid breakdown. The mites can be infected by both bacteria (*Cardinium* and *Wolbachia*), i. e. double infections, or by several strains of bacteria, i. e. multiple infections. The possible application of symbiotic/parasitic bacteria in the control of pest mites is discussed. The studied bacteria are suitable models for description of the arthropod bacterial interactions.

Key words: *Cardinium*, *Wolbachia*, mites, Acari, reproductive parasite, cytoplasmic incompatibility

Obsah

1.	Úvod.....	1
2.	Definice pojmů používaných v této bakalářské práci	2
3.	Literární přehled	3
3.1.	<i>Candidatus Cardinium hertigii</i>	3
3.1.1.	Morfologie a lokalizace.....	4
3.1.2.	Vlivy bakterie <i>Cardinium</i> na fenotyp hostitele	6
3.1.2.1.	Feminizace	6
3.1.2.2.	Cytoplazmatická inkompatibilita	7
3.2.	<i>Wolbachia pipientis</i>	10
3.2.1.	Morfologie a lokalizace.....	11
3.2.2.	Vlivy bakterie <i>Wolbachia</i> na fenotyp hostitele	12
3.2.2.1.	Selhání hybridů (Hybrid breakdown).....	12
3.2.2.2.	Cytoplazmatická inkompatibilita	14
3.2.2.3.	Plodnost.....	18
3.2.2.4.	Partenogeneze.....	18
3.3.	Dvojnásobné infekce (Double infections).....	20
3.3.1.	Vlivy bakterií <i>Cardinium</i> a <i>Wolbachia</i> na fenotyp hostitele.....	20
3.3.1.1.	Cytoplazmatická inkompatibilita	20
3.3.1.2.	Plodnost.....	21
3.4.	Násobné infekce (Multiple infections)	22
3.4.1.	Vlivy bakterií <i>Cardinium</i> a <i>Wolbachia</i> na fenotyp hostitele.....	22
3.4.1.1.	Cytoplazmatická inkompatibilita	22
3.4.1.2.	Plodnost.....	22
3.4.1.3.	Životnost.....	23
4.	Závěr.....	23
5.	Seznam zkratk	25
6.	Literatura	26

1. Úvod

Bakterie *Candidatus Cardinium hertigii* (dále *Cardinium*) a *Wolbachia pipientis* (dále *Wolbachia*) jsou nepříbuzné bakterie, které bývají označovány za endosymbionty nebo reprodukční parazity (Zchori-Fein et al. 2001, Werren et al. 1995). Z dosavadních studií není jednoznačně jisté, jestli jsou hostiteli prospěšní nebo mu manipulace s jeho reprodukcí spíše škodí. Podle Weeks et al. (2007) se tento stav může měnit a vyvíjet během života jedince. Výzkum Hoffmann et al. (1990) populací *Drosophila simulans* Sturtevant, 1919 (Diptera: Drosophilidae) v Kalifornii prokázal, že samice infikované bakterií *Wolbachia* trpí sníženou plodností oproti neinfikovaným samicím. Tento experiment opakoval po téměř 20 letech Weeks et al. (2007) s rozdílnými výsledky, kdy naopak infikované samice vykazovaly zvýšení plodnosti ve srovnání s neinfikovanými, což svědčí pro mutualistický vztah (Weeks et al. 2007).

Obě bakterie jsou přenášeny vertikálně z matky na potomstvo a posilují svůj přenos manipulací s reprodukcí hostitele (Hoffmann & Turelli 1988, Zchori-Fein et al. 2001). Rozličné interakce mezi těmito mikroorganismy a hostiteli jsou odrazem selekce. Vzhledem k maternálnímu přenosu a tedy úzkému vztahu reprodukce bakterie a hostitele jsou pozitivně selektovány ty bakterie, které jsou prospěšné hostiteli zodpovědnému za jejich přenos, tj. infikované samice. Stejně jsou selektovány i bakterie, jež snižují fitness hostitelům, kteří nejsou spojeni s jejich přenosem, tj. samci a neinfikované samice, čímž dochází k nárůstu fitness infikovaných samic (Werren & O'Neill 1997).

Obě bakterie se vyskytují v členovcích a hlísticích, bakterie *Cardinium* bývá nejčastěji nacházena v roztočích a pavoucích, oproti tomu výskyt bakterie *Wolbachia* je nejvyšší u hmyzu. Bakterie *Cardinium* se nachází v řádech hmyzu Coleoptera (brouci), Hymenoptera (blanokřídlí), Hemiptera (polokřídlí) a Diptera (dvoukřídlí) a dále v řádech klepátkců, Araneae (pavouci), Scorpiones (štíři), Opiliones (sekáči), Prostigmata (sametkovci), Mesostigmata (čmelíkovci) a Ixodida (klíšťata) (Zchori-Fein et al. 2004, Martin & Goodacre 2009, Nakamura et al. 2009). Bakterie *Wolbachia* napadá zejména hmyz, roztoče (Jeyaprakash & Hoy 2000, Hilgenboecker et al. 2008), pavouky (Rowley et al. 2004) a štíry (Baldo et al. 2007).

Cílem bakalářské práce je shrnout dosud známé poznatky o interakcích bakterie *Cardinium* s roztoči (Acari) a interakcích bakterie *Wolbachia* s roztoči (Acari). Do práce jsou rovněž zahrnuty dvojité infekce těmito bakteriemi, kdy jsou roztoči napadeni jak bakterií

Cardinium, tak *Wolbachia*, a násobné infekce, kdy jsou roztoči nakaženi několika liniemi zmíněných bakterií.

2. Definice pojmů používaných v této bakalářské práci

Cytoplazmatická inkompatibilita (dále CI):

CI může být jednosměrná, kdy při křížení infikovaného samce s neinfikovanou samicí dojde ke snížení počtu potomků doprovázeného dominancí samčích potomků, nebo je způsobena úplná sterilita samice. Reciproké křížení vykazuje normální plodnost (Hoffmann et al. 1986). K obousměrné CI dochází v případě křížení samce infikovaného jednou linií mikroorganismu se samicí infikovanou jinou linií téhož mikroorganismu (Breeuwer & Werren 1990, O'Neil et al. 1990).

Feminizace:

Bakterie změny genetické samce na fenotypově se jevící samice (Juchault et al. 1994).

Selhání hybridů (Hybrid breakdown, dále HB):

Selhání hybridů je postzygotický reprodukčně izolační mechanismus, ke kterému dochází u členovců při křížení jedinců z dvou odlišných linií nebo populací, kdy vzniklé hybridní samice produkují potomstvo se sníženou fitness ve srovnání s parentální a F1 generací. Projev HB bývá tedy zaznamenán v F2 nebo dalších generacích (Breeuwer & Werren 1995, Burton et al. 2006, Ellison et al. 2008).

Reprodukce roztočů – haplodiploidie:

U skupin roztočů, kterými se zabývá má práce, tj. Tetranychidae (Prostigmata), Tenuipalpidae (Prostigmata), Phytoseiidae (Mesostigmata), je majoritním způsobem reprodukce **arrhenotokní partenogeneze** neboli haplodiploidie, při které se haploidní samci vyvíjejí z neoplozeného vajíčka a diploidní samice z oplozeného vajíčka. Dalším způsobem je **thelytokní partenogeneze**, kdy dochází k vývoji jedinců z neoplozeného vajíčka, dominantně zastoupeny jsou samice a samci se objevují zřídka nebo zcela chybí (shrnutí v Oliver et al. 1971).

3. Literární přehled

3.1. *Candidatus Cardinium hertigii*

Bakterie *Cardinium* (Sphingobacteriales: Flexibacteraceae) tvoří monofyletický bakteriální taxon kmene Bacteroidetes (Zchori-Fein et al. 2004). Jedním z prvních záznamů existence bakterie *Cardinium* je popis prokaryotního organismu nalezeného v buňkách klíštěte jeleního *Ixodes scapularis* Say, 1821 (Ixodida: Ixodidae) z roku 1996. Podle Kurtti et al. (1996) tato intracelulární bakterie oválného tvaru byla v přímém kontaktu s hostitelskou cytoplazmou a v průměru dosahovala 0,6 μm až 2,0 μm . Charakteristickým znakem byla souběžná řada výběžků táhnoucí se z vnitřní vrstvy její membrány do prostoru cytoplazmy (Kurtti et al. 1996).

Později byla bakterie *Cardinium* spojována s různými druhy manipulace s reprodukcí hostitele. Bylo prokázáno, že haploidní partenogeneze samic roztoče sviluše fénické (*Brevipalpus phoenicis*) (Geijskes, 1939) (Prostigmata: Tenuipalpidae) je způsobena bakteriální infekcí, která se projevuje feminizací genetických samců. Tato bakterie s 98% sekvenční homologií k bakterii izolované z *I. scapularis* byla označena za blízce příbuznou bakterie *Cardinium* (Weeks et al. 2001). Bakterie *Cardinium* byla označena jako původce thelytokní partenogeneze několika druhů parazitické vosičky rodu *Encarsia* sp. (Hymenoptera: Aphelinidae), získané sekvence 16 SRNA vykazovaly 96% podobnost se sekvencemi endosymbionta z *I. scapularis* (Zchori-Fein et al. 2001). V roce 2003 bylo zjištěno, že bakterie rodu *Wolbachia*, tj. bakterie ze skupiny α -Proteobacteria, není jediná, kdo způsobuje cytoplazmatickou inkompatibilitu. Ta byla zaznamenána u sexuální populace parazitoidu *Encarsia pergandiella* Howard, 1907 (Hymenoptera: Aphelinidae) (Hunter et al. 2003), a dále u dvou druhů svilušek svilušky suginamské (*Eotetranychus suginamensis* Yokoyama, 1932) (Prostigmata: Tetranychidae) (Gotoh et al. 2007a) a *Bryobia sarothamni* Geijskes, 1939 (Prostigmata: Tetranychidae) (Ros & Breeuwer 2009). Jejím původcem byla bakterie *Cardinium*, v té době ještě nazývaná CFB (Cytophaga-Flexibacter-Bacterioide) nebo CLO (Cytophaga-Like-Organism).

Osm let po svém objevu byl na základě elektronové mikroskopie a analýzy sekvencí genu *gyrB* kódujícím gyrázu a 16S rRNA genů popsán nový rod a bakterii byl navržen vědecký název „*Candidatus Cardinium hertigii*“ (Zchori-Fein et al. 2004).

3.1.1. Morfologie a lokalizace

PCR je schopnou metodou detekce bakteriálních endosymbiontů členovců. Nedokáže však zajistit informace ohledně vnitřní struktury bakterií, jejich lokalizace či rozmístění v hostiteli. Ke zjištění těchto aspektů je vhodným nástrojem elektronová mikroskopie či fluorescenční in situ hybridizace (Kitajima et al. 2007).

Tvar buněk bakterie *Cardinium* se různí od oválného či elipsového až do protáhlého klobásovitého tvaru (Chang & Musgrave 1972, Zchori-Fein et al. 2001, Bigliardi et al. 2006, Kitajima et al. 2007). Délka největších buněk se pohybuje mezi 4 – 5 μm a šířka mezi 0,5 – 1 μm (Kitajima et al. 2007). Buňky bakterie *Cardinium* jsou obklopeny dvojrstevným obalem, tenkou gramnegativní buněčnou stěnou a plazmatickou membránou (Zchori-Fein et al. 2001, Kitajima et al. 2007). Plazmatická membrána se skládá ze tří částí: vnitřní membrány, mezimembránového prostoru a vnější membrány (Chang & Musgrave 1972). Buňky bakterie *Cardinium* obsahují malé ribozomy (Chang & Musgrave 1972, Kitajima et al. 2007) a fibrilární DNA (Kitajima et al. 2007).

Charakteristickou vlastností bakterie *Cardinium* je svazek tenkých podlouhlých struktur v rovnoběžných řadách, které jsou připojeny k vnitřní membráně bakteriální buňky (Zchori-Fein et al. 2001, 2004, Bigliardi et al. 2006, Marzorati et al. 2006, Kitajima et al. 2007). Tyto typické kartáčovité ultrastruktury bývají popisovány jako mikrofilamenta nebo tubuly (Microtubule-like-structures, dále MLs) (Chang & Musgrave 1972, Kurtti et al. 1996, Zchori-Fein et al. 2001). Podle pozorování Zchori-Fein et al. (2004) není délka, pravidelnost a umístění MLs v buňce pro *Cardinium* univerzální a je možno nalézt několik typů těchto struktur. Dominantní jsou pravidelné rovnoběžné řady, které se táhnou od vnitřní membrány přibližně do poloviny prostoru cytoplazmy a směřují kolmo k zadnímu konci těla bakterie. Objevují se však i MLs, které vybíhají přímo ze zadní části bakteriálního těla. V jedné bakterii byly dokonce zachyceny MLs sbíhající se k sobě z opačných stran a spojující se ve středu prostoru cytoplazmy (Zchori-Fein et al. 2004). Oproti tomu výzkum Kitajima et al. (2007) popisuje jednotnost délky a průměru řezu u MLs roztoče rodu *Brevipalpus* (Prostigmata: Tenuipalpidae). Podle Zchori-Fein et al. (2001) MLs nemusí být přítomny v každé bakterii a dokonce mohou chybět v jedné z dceřiných buněk při procesu dělení, což může být způsobeno neschopností tyto struktury detekovat ve všech řezech, nebo MLs nejsou předávány do obou dceřiných buněk.

Podle Bigliardi et al. (2006) jsou MLs pouze jednou ze tří složek komplexu obsahujícího mikrotubulům podobné elementy (dále MLC). Druhou je fibrózní elektrodenzní vrstva (dále FEP) a třetí složka zahrnuje sadu rovnoměrně rozmístěných elektrodenzních

struktur přitíštěných k vnější vrstvě plazmatické membrány (dále ES). FEP je amorfni vrstva souběžná s plazmatickou membránou, do níž se noří ML a prochází jí. ES propojují vnější membránu a vnější vrstvu plazmatické membrány a podílejí se tak na jejím upevnění (Bigliardi et al. 2006). Funkce MLC není zatím známa, Bigliardi et al. (2006) se však domnívá, že může sloužit jako prostředek komunikace mezi membránou a buněčnou stěnou, fungovat jako cytoskelet či mít roli v intracelulárním transportu.

Ultrastruktura MLs je unikátní mezi bakteriemi a umožňuje bezpečné rozeznání bakterie *Cardinium*. Nebyla nalezena dokonce ani v nejbližším známém příbuzném bakteri *Cardinium „Candidatus Amoebophilus asiaticus“*, bakteri kmene Bacteroidetes napadající protistální organismy rodu *Acanthamoeba* (Horn et al. 2001, Schmitz-Esser et al. 2008). *Amoebophilus* se velikostí, stavbou i polohou v hostiteli značně liší od bakterie *Cardinium*, tyto 0,7-1,4 μm velké bakterie jsou obaleny membránou s ribozomy, která je pravděpodobně odvozena z drsného endoplazmatického retikula hostitele (Horn et al. 2001).

Pozoruhodnou vlastností bakterie *Cardinium* je, že je v přímém kontaktu s hostitelskou cytoplazmou a není obklopena membránou pocházející od hostitele (Kurti et al. 1996, Zchori-Fein et al. 2004, Kitajima et al. 2007, Sacchi et al. 2008).

Je pochopitelné, že bakterie *Cardinium*, jež je považována za reprodukčního parazita, je umístěna primárně v tkáních rozmnožovacího ústrojí hostitele. Tak je tomu u parazitické vosičky *Encarsia* (Hymenoptera: Aphelinidae), u které bylo *Cardinium* nalezeno ve tkáni vaječníků zahrnující podpůrné buňky, folikulární buňky a vyvíjející se oocyty (Zchori-Fein et al. 2001, 2004). Totéž platí u *Plagiomerus diaspidis* Crawford, 1910 (Hymenoptera: Encyrtidae), kde byla naměřena nejvyšší koncentrace bakterie *Cardinium* v germariu hostitele a nejnižší ve zralých oocytech (Matalon et al. 2007). Oproti tomu křísek révový (*Scaphoideus titanus* Ball, 1932) (Hemiptera: Cicadellidae) obsahuje *Cardinium* nejen v reprodukčních orgánech, ale i v tukovém tělisku a slinných žlázách hostitele (Marzorati et al. 2006, 2008).

Odlišným případem jsou roztoči sviluše fénická (*Brevipalpus phoenicis* Geijskes, 1939), sviluše oválná (*B. obovatus*) Donnadieu, 1875 a sviluše kalifornská (*B. californicus* Banks, 1904) (Prostigmata: Tenuipalpidae), u nichž Kitajima et al. (2007) pomocí transmisní elektronové mikroskopie prokázal přítomnost bakterie *Cardinium* v každé části těla hostitelů. Bakterie *Cardinium* byla detekována v epidermis, očním komplexu, svalech, tukovém tělisku, epitelu trávicí soustavy, nervových buňkách, tracheálních buňkách, prosomální žláze, vaječnících a vyvíjejících se oocytech. Počet a umístění bakterií se však značně lišil s ohledem na jednotlivé vnitřní orgány, životní stadia a samotné jednotlivce (Kitajima et al. 2007). V případě roztoče svilušky Piercovy (*Tetranychus piercei*) McGregor, 1950

(Prostigmata: Tetranychidae) byla bakterie *Cardinium* nalezena v oocytech, podpůrných buňkách, vejcovodu, samčí gonádě a střevě (LuYu et al. 2012).

Poznatek, že je *Cardinium* přítomno ve všech tkáních hostitele, vede k úvaze, že došlo k přenosu bakterie do buněk roztoče během rané embryogeneze (Kitajima et al. 2007). Jiným vysvětlením může být nákaza neinfikovaných buněk skrz pohyb buňky bakterie. S ohledem na široký výskyt bakterie *Cardinium* v celém těle roztoče je pravděpodobné, že neovlivňuje pouze reprodukci a udržování této bakterie je pro roztoče výhodné (Kitajima et al. 2007).

3.1.2. Vlivy bakterie *Cardinium* na fenotyp hostitele

3.1.2.1. Feminizace

Roztoči rodu *Brevipalpus* (Prostigmata: Tenuipalpidae), *B. phoenicis*, *B. californicus* a *B. obovatus*, se rozmnožují thelytokní partenogenezí (Helle et al. 1980 v Weeks et al. 2001), kdy dochází k vývoji jedinců z neoplozeného vajíčka a samci se objevují zřídka nebo zcela chybí (Pijnacker et al. 1981 v Weeks et al. 2001). Všechny tři druhy mají haploidní samce i samice (Pijnacker et al. 1980, Weeks et al. 2001, Groot & Breeuwer 2006) a byla u nich prokázána infekce bakterií *Cardinium* (Weeks et al. 2001, 2003, Chigira & Miura 2005, Groot & Breeuwer 2006). V laboratorních experimentech, kde byly kolonie *B. phoenicis*, *B. obovatus* a *B. californicus* přeléčeny antibiotiky (tetracyklin-hydrochlorid), došlo k nárůstu samců, což vede k závěru, že *Cardinium* způsobuje thelytokní partenogenezi feminizací neoplozených haploidních vajíček (Weeks et al. 2001, Chigira & Miura 2005, Groot & Breeuwer 2006).

Počty samčích potomků u rodu *Brevipalpus* se však značně liší u různých druhů, mezi výzkumnými laboratořemi i v rámci jednotlivých populací. Výsledky se mohou pohybovat od 0 % až do 78 % samčích potomků. Tato nevyváženost může být způsobena několika faktory. Účinnost přenosu symbionta může být ovlivněna věkovou strukturou populace, různou skladbou endosymbiontů v hostiteli, odlišnými způsoby thelytokní partenogeneze či rozdíly v množství dodaných antibiotik či kvalitě potravy roztočů (Groot & Breeuwer 2006).

V případě *B. californicus* byly zaznamenány počty samčích potomků 51 % (Chigira & Miura 2005) a v případě *B. phoenicis* dokonce 78 % (Weeks et al. 2001). Výsledky Groot & Breeuwer (2006) u obou druhů byly však až desetinásobně nižší, což lze vysvětlit věkem zkoumaných samic roztočů. Bylo prokázáno, že syny produkují pouze mladé samice. Z tohoto

důvodu dosáhli Groot & Breeuwer (2006) pracující se širokým věkovým spektrem samic nižších výsledků oproti Weeks et al. (2001), jenž používal ve svém výzkumu převážně mladé samice (Groot & Breeuwer 2006).

Zvláštním případem jsou některé linie *B. obovatus*, které neprodukovaly žádné samce za standardních laboratorních podmínek, ale ani po léčbě antibiotiky. *Cardinium* zde proto nemůže mít na partenogenezi vliv. Vysvětlením může být přítomnost jiného symbionta odolného vůči antibiotické léčbě nebo může jít o zděděnou vlastnost genetického charakteru (Groot & Breeuwer 2006).

3.1.2.2. Cytoplazmatická inkompatibilita

Eotetranychus suginamensis (Yokoyama, 1932)

Metodou křížení roztočů svlušky suginamské (*Eotetranychus suginamensis*) (Prostigmata: Tetranychidae) infikovaných bakterií *Cardinium* s neinfikovanými bylo prokázáno, že tato bakterie způsobuje cytoplazmatickou inkompatibilitu. Při zkřížení infikovaných samců s neinfikovanými samicemi bylo pozorováno značné snížení líhnivosti a počtu dcer v F₁ generaci ve srovnání s kompatibilními kříženími, tj. infikovaná samice a neinfikovaný samec, oba infikovaní či oba neinfikovaní. V 5/34 křížení nedošlo k produkci samičích potomků (Gotoh et al. 2007a).

Bryobia sarothamni Geijskes, 1939

Ještě silnější efekt cytoplazmatické inkompatibility zaznamenali Ros & Breeuwer (2009) u roztoče *Bryobia sarothamni* (Prostigmata: Tetranychidae). Při zkřížení samce infikovaného bakterií *Cardinium* s neinfikovanou samicí došlo ke změně poměru pohlaví s téměř 100% dominancí samců. K produkci samičího potomka došlo pouze v jednom případě z 16 křížení. Dalšími projevy nákazy bakterií *Cardinium* byl nárůst potracených vajíček, snížení počtu dcer a celkového počtu hostitelského potomstva. K produkci inkompatibilního potomstva došlo i v případě zkřížení samce infikovaného bakterií *Cardinium* se samicí infikovanou bakterií *Wolbachia* nebo s dvojité infikovanou samicí, tj. infikovanou bakteriemi *Cardinium* a *Wolbachia*. Stejně jako v předchozím případě byla u těchto křížení pozorována změna poměru pohlaví ve prospěch samců, dále pokles líhnivosti, počtu samičích potomků a celkového potomstva (Ros & Breeuwer 2009).

Pozoruhodné je, že dvojitá infekce samce bakteriemi *Wolbachia* a *Cardinium* nemá při křížení u roztoče *B. sarothamni* žádný vliv na fenotyp a nezpůsobila cytoplazmatickou inkompatibilitu (Ros & Breeuwer 2009).

Podle modification-rescue modelu (Werren 1997) *Cardinium* způsobuje změnu spermií infikovaného samce, která vede k poškození otcovských chromozomů s následnou neschopností segregace při procesu mitotického dělení (Breeuwer & Werren 1990, Tram et al. 2006). Pokud se však ve vajíčku nachází stejná linie endosymbionta může být modifikace „zachráněna“ a k CI nedojde. V případě roztoče *B. sarothamni* došlo k „záchrance“ při křížení páru infikovaného bakterií *Cardinium* a CI se neprojevila. Křížení samce nakaženého bakterií *Cardinium* se samicí infikovanou bakterií *Wolbachia* nebo s dvojitě infikovanou samicí však vede k CI. Neschopnost „záchrany“ u křížení samce infikovaného bakterií *Cardinium* a dvojitě infikovanou samicí může být způsobeno rozdíly v liniích bakterií, které mohou disponovat různými modification-rescue systémy. Dalším vysvětlením je, že bakterie *Wolbachia* dokáže zabránit bakterii *Cardinium* v „záchrance“ (Ros & Breeuwer 2009).

Metaseiulus occidentalis (Nesbitt, 1951)

Jedním z dalších efektů bakterie *Cardinium* na fenotyp hostitele je podle Weeks & Stouthamer (2004) zvýšení plodnosti u *Metaseiulus occidentalis* (Mesostigmata: Phytoseiidae). Tento projev byl zaznamenán u infikovaných samic nezávisle na stavu infekce samce ve srovnání s neinfikovanými samicemi. Pomocí tetracyklinové léčby bylo prokázáno, že infekce způsobená bakterií *Cardinium* nemá vliv na životaschopnost vajíček či úmrtnost. V jedné linii byl ovlivněn i poměr pohlaví, kdy potomci infikovaných samic zkrížených s infikovanými samci dosáhli nižšího poměru pohlaví ve prospěch samců než neinfikované samice zkrížené s infikovanými samci (Weeks & Stouthamer 2004). Weeks & Stouthamer (2004) dále uvádí, že výsledkem srovnání populace nakažené bakterií *Cardinium* a populace léčené tetracyklinovou léčbou byl pokles plodnosti léčené populace. Tyto projevy však nelze jednoznačně přisoudit vlivu bakterie *Cardinium*, protože nárůst plodnosti může způsobovat jiný mikroorganismus, jenž byl antibiotiky eliminován (Wu & Hoy 2012a). Proto Wu & Hoy (2012b) použili populaci, ve které se *Cardinium* přirozeně nevyskytovalo kvůli neschopnosti přenosu bakterie *Cardinium* z matky do vajíček. Srovnáním této populace s nakaženou populací došli ke zcela opačným výsledkům. Při zkrížení neinfikovaných samic se samci infikovaných bakterií *Cardinium* byl pozorován pokles počtu vajíček, snížení počtu jedinců dožívajících se dospělosti, vyšší koncentrace bakterie *Cardinium* v samicích než samcích a téměř nulový výskyt samičích potomků ve srovnání s ostatními možnostmi křížení. Tyto

výsledky prokazují, že *Cardinium* způsobuje u *M. occidentalis* cytoplazmatickou inkompatibilitu. Ve třech kompatibilních kříženích nebyly zaznamenány rozdíly v plodnosti roztoče. Tato skutečnost značně odporuje výsledkům Weeks & Stouthamer (2004), což může být zapříčiněno genetickými rozdíly mezi populacemi *M. occidentalis* dvou různých pracovišť, skutečností, že roztoči Wu & Hoy (2012b) byli vyvinuti s rezistencí k pesticidům, či rozdílnými koncentracemi bakterie *Cardinium* v populacích roztoče, které v případě Weeks & Stouthamer (2004) nebyly zaznamenány.

Reprodukční inkompatibilita *M. occidentalis* byla zkoumána již v roce 1998 výzkumníky Johanowicz & Hoy (1998, 1999), podle kterých ji způsobovala *Wolbachia*. Zkřížením samce nakaženého bakterií *Wolbachia* a samice ošetřené vysokou teplotou pro eliminování bakterie *Wolbachia* byl pozorován pokles vajíček, absence samičích potomků a změna poměru pohlaví ve prospěch samčího ve srovnání ostatními možnými kříženími. Zjištěná inkompatibilita byla přisouzena přítomnosti bakterie *Wolbachia*. Podle Wu & Hoy (2012b) však *Wolbachia* pochází z jeho kořisti svilušky chmelové (*Tetranychus urticae*) C. L. Koch, 1836 (Prostigmata: Tetranychidae) a není endosymbiontem *M. occidentalis*, což prokázali vyhladověním *M. occidentalis*, kdy po 72 hodinách množství bakterie *Wolbachia* snížili téměř o 100 %. Stejnému experimentu podrobili bakterii *Cardinium*, jejíž množství se po 72 hod nezměnilo a ve svilušce chmelové nebyla detekována. Bakterie *Cardinium* je tedy považována za endosymbionta *M. occidentalis* a je pravděpodobně zodpovědná za reprodukční abnormality pozorované v tomto roztoči (Wu & Hoy 2012a, 2012b).

Podle Johanowicz & Hoy (1998) vysvětlení produkce výlučně samčího potomstva tkví v reprodukčním systému těchto roztočů. Jedná se o reprodukční systém parahaploidie, kde jsou samice diploidní a samci haploidní. V případě samců dochází po oplození vajíčka ke ztrátě otcovského chromozomu a jeho vyloučení z jádra. Výsledkem je haploidní samčí embryo (Nelson-Rees et al. 1980 v Johanowicz & Hoy 1998). Mechanismus bakterie *Wolbachia* způsobující CI spočívá v narušení funkce otcovských chromozomů, které jsou v případě samčího potomstva u parahaploidních druhů stejně odstraněny (Johanowicz & Hoy 1998). Tyto závěry můžeme aplikovat i na bakterii *Cardinium*, jejíž mechanismus působící CI bude pravděpodobně velmi podobný.

Sviluška chmelová (*Tetranychus urticae*) C. L. Koch, 1836 a faktory ovlivňující CI

K CI dochází i u roztočů sviluška Piercova (*Tetranychus piercei*) a sviluška chmelová (*Tetranychus urticae*) (Prostigmata: Tetranychidae), jež se u inkompatibilních párů projevuje

nižší líhnivostí, vysokou mírou potracených vajíček a poklesem samic ve srovnání s ostatními třemi kříženími (Zhu et al. 2012, Xie et al. 2010).

CI může být ovlivněna několika faktory, jako genotyp hostitele, bakteriální linie, bakteriální hustota nebo věk samců (Reynolds & Hoffmann 2002). U svilušky chmelové bylo zjištěno, že projev CI se liší v závislosti na stáří samce a hustotě bakterie *Cardinium* přítomné v hostiteli. Křížení neinfikované samice a infikovaného jeden den starého samce vykazovalo znaky CI. Se zvyšujícím se věkem samce však docházelo ke snižování tohoto projevu a u 12 dnů starých samců již CI nebylo vůbec zaznamenáno (Xie et al. 2010). Se zvyšujícím se věkem samců byl naměřen i pokles hustoty bakterie *Cardinium*. Podle Xie et al. (2010) je hustota bakterie *Cardinium* klíčovým faktorem pro míru projevu CI a pro vyvolání CI je nutná určitá hranice hustoty této bakterie.

3.2. *Wolbachia pipientis*

Tato intracelulární bakterie tvoří monofyletický rod *Wolbachia* (Rickettsiales: Rickettsiaceae) náležící do třídy α -Proteobakterie (Hertig & Wolbach 1924, Hertig 1936, O'Neill et al. 1992). Poprvé bakterii *Wolbachia* popsali Hertig & Wolbach (1924) v gonádách komára pisklavého (*Culex pipiens*) Linnaeus, 1758 (Diptera: Culicidae). Podle Hertig & Wolbach (1924) se jednalo o tyčinkovitou nebo kokoidní gramnegativní bakterii. Šířka tyčinkovitých bakterií se pohybovala v rozmezí 0,2 – 0,3 μm a délka v rozmezí 0,4 – 3,0 μm . Velikost kokoidních bakterií činila v průměru 0,6 – 0,8 μm (Hertig & Wolbach 1924).

V roce 1936 byl popsán nový druh bakterie se znaky skupiny Rickettsiae a bakterii byl navržen vědecký název *Wolbachia pipientis* (Hertig 1936). Na základě sekvencí bakteriálních genů 16S rRNA, *ftsZ* a genu pro protein *wsp*, se bakterie *Wolbachia* dělí na osm rozdílných superskupin (A-H), kdy superskupiny A, B, E, F a G jsou asociovány s výskytem v členovcích (O'Neill et al. 1992, Werren et al. 1995, Zhou et al. 1998, Bordenstein & Rosengaus 2005, Lo et al. 2002, 2007).

Postupem času byl zjištěn její výskyt v širokém spektru hostitelů a bakterie *Wolbachia* byla označena za původce několika způsobů manipulace s reprodukcí hmyzího hostitele, tj. cytoplazmatická inkompatibilita (O'Neill et al. 1992), partenogeneze (Stouthamer et al. 1990), feminizace (Kageyama et al. 2002) a zabíjení samců (Hurst et al. 1999).

Jako první efekt asociovaný s reprodukcí roztočů byla považována cytoplazmatická inkompatibilita u svilušky chmelové (*Tetranychus urticae*) a *Tetranychus turkestani* Ugarov

& Nikolskii, 1937 (Prostigmata: Tetranychidae) (Breeuwer 1997). Dále byl zjištěn projev partenogeneze u dvou druhů roztočů rodu *Bryobia* (Weeks & Breeuwer 2001) či selhání hybridů u svlušky chmelové (Vala et al. 2000). Bylo zjištěno, že bakterie *Wolbachia* může dokonce ovlivňovat plodnost (Vala et al. 2000, Perrot-Minnot et al. 2002) či volbu partnera samice svlušky chmelové (Vala et al. 2004).

Ač je bakterie *Wolbachia* nejprozkoumanějším mikroorganismem manipulujícím s reprodukcí hostitele, její interakce s roztoči byly zkoumány pouze okrajově a ve velmi úzké škále hostitelů. Hlavním důvodem je pravděpodobně její majoritní výskyt v hmyzích hostitelích. Vzhledem k možnosti použití získaných informací k biologické kontrole roztočů by bylo vhodné rozšířit výzkum na větší množství druhů.

3.2.1. Morfologie a lokalizace

Bakterii *Wolbachia* poprvé popsal a taxonomicky vymezil Hertig (1936). Můžeme ji nalézt ve dvou formách. První z nich má tyčinkovitý tvar a její velikost se pohybuje mezi 0,5 – 1,3 μm (délka). Tvar druhé formy je kokoidní a měří v průměru 0,25 – 0,5 μm . Druhá forma může fungovat samostatně nebo tvořit shluky několika forem, kdy nabývá obrovských rozměrů (1 – 1,8 μm v průměru) (Hertig 1936, Stouthamer 1999, Oh et al. 2000). Bakterie *Wolbachia* se nachází v trojvrstvých váčcích (Callaini et al. 1994, Kose & Karr 1995) derivovaných z Golgiho aparátu (Cho et al. 2011), kdy nejsvrchnější vrstva pochází od hostitele. Dále je obklopena bakteriální buněčnou stěnou a plazmatickou membránou (Louis & Nigro 1989 v Stouthamer et al. 1999).

Lokalizace této bakterie u roztočů není příliš známá, proto je zde uvedena lokalizace u hmyzu, která byla studována častěji. Bakterie *Wolbachia* se primárně nachází v tkáních reprodukčních orgánů. Tak tomu je u komára pisklavého *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) (Hertig 1936), u *Aphytis yanonensis* DeBach & Rosen, 1982 a *A. lingnanensis* Compere, 1955 (Hymenoptera: Aphelinidae) (Zchori et al. 1998), u komára tygrovaného (*Aedes albopictus* Skuse, 1894) (Diptera: Culicidae) (Chen et al. 2005), u *Nasonia vitripennis* (Walker, 1836) (Hymenoptera: Pteromalidae) (Clark et al. 2008), u bodavky dobytčí (*Glossina morsitans morsitans* Wiedemann, 1850) a *Glossina brevipalpis* Newstead, 1910 (Diptera: Glossinidae) (Cheng et al. 2000), u *Drosophila simulans* a octomilky obecné (*D. melanogaster*) Meigen, 1830 (Diptera: Drosophilidae) (McGraw et al. 2002, Riparbelli et al. 2007, Frydman et al. 2006). Dále byla bakterie *Wolbachia* nalezena v reprodukčním

ústrojí pavouka nefila kyjovitá (*Nephila clavata*) L. Koch, 1878 (Araneae: Nephilidae) (Oh et al. 2000).

Výskyt bakterie *Wolbachia* byl však zaznamenán i mimo reprodukční orgány hostitelů. Bakterie *Wolbachia* byla detekována v neuronech mozku (Min & Benzer 1997) či v každé části těla *D. melanogaster* (Clark et al. 2005). Stejně tak výsledky Dobson et al. (1999) dokázaly, že kromě gonád *D. simulans* se bakterie *Wolbachia* vyskytuje i v hlavě, tukovém tělese, malphigických trubicích, střevě a svalech thoraxu. Dále byla bakterie *Wolbachia* nalezena v slinných žlázách komára tygrovaného (*Aedes albopictus*) (Chen et al. 2005) a v každé buňce těla *Glossina austeni* Newstead, 1912 (Diptera: Glossinidae) (Cheng et al. 2000).

V případě roztoče *T. piercei* byla bakterie *Wolbachia* nalezena v oocytech, podpůrných buňkách, vejcovodu, samčí gonádě a střevě (LuYu et al. 2012). Vzhledem k nízkému počtu vědeckých prací zabývajících se lokalizací bakterie *Wolbachia* v roztočích lze toto téma doporučit k dalšímu studiu.

3.2.2. Vlivy bakterie *Wolbachia* na fenotyp hostitele

3.2.2.1. Selhání hybridů (Hybrid breakdown)

Selhání hybridů je postzygotický reprodukčně izolační mechanismus, ke kterému dochází u členovců při křížení jedinců z dvou odlišných linií nebo populací, kdy vzniklé hybridní samice produkují potomstvo se sníženou fitness ve srovnání s parentální a F1 generací. Projev HB bývá tedy zaznamenán v F2 nebo dalších generacích (Breeuwer & Werren 1995, Burton et al. 2006, Ellison et al. 2008). Vala et al. (2000) však popisuje možnost projevu HB i v případě křížení inkompatibilního páru jedinců stejné populace lišící se infekčním statutem, tj. křížení nakaženého samce s nenakaženou samicí.

Ve studii Vala et al. (2000) byly zkoumány dvě populace roztoče svilušky chmelové (*Tetranychus urticae*) pocházející z odlišných stanovišť, R (rose) a C (cucumber). Obě tyto populace byly nakaženy bakterií *Wolbachia* a pro účel experimentu byli někteří roztoči přeléčení tetracyklinovými antibiotiky pro odstranění bakterie *Wolbachia*. Následně došlo při křížení nakaženého samce s nenakaženou samicí R populace k projevu HB, jenž byl manifestován vysokou mortalitou a dramatickým poklesem samčího potomstva F2 generace oproti zbývajícím třem křížením. K ještě silnějšímu projevu HB došlo v případě křížení nakaženého samce R populace s nenakaženou samicí C populace, u kterého byla kromě zvýšené mortality a nižšího počtu samčího potomstva F2 generace pozorována nižší snůška

F1 samic. K takto silnému projevu HB došlo i v případě křížení infikovaného samce R populace s neinfikovanou samicí C populace. Pro projev tohoto reprodukčně izolačního mechanismu je tedy klíčový infekční status samce. Svou roli však hraje i nákaza bakterií *Wolbachia* u samice. V případě, že je samice infikována a kříží se s infikovaným samcem, dojde ke snížení projevu HB ve srovnání s nenakaženou samicí kříženou s nakaženým samcem. Nakažené samice mají větší snůšky a menší mortalitu. Vysvětlením je pravděpodobně schopnost bakterie *Wolbachia* C populace „zachránit“ modifikaci spermií R populace (Vala et al. 2000).

Ač Vala et al. (2000) zkoumali pouze allopatrické linie, domnívají se, že bakterie *Wolbachia* je schopná tvorby reprodukční bariéry i v sympatrické speciaci. V případě sympatrické speciace dochází často k vytvoření reprodukčně izolačního mechanismu z důvodu zachování adaptace na habitat. Pokud by reprodukční bariéra vytvořena nebyla, může bakterie *Wolbachia* k její tvorbě přispět a zabránit tak vymizení adaptovaného genomu rekombinací. V případě silného reprodukčně izolačního mechanismu adaptace na habitat přetrvává v populaci (Dieckmann & Doebelli, 1999; Kondrashov & Kondrashov, 1999).

Při obdobném experimentu Vala et al. (2003) nebyly naopak projevy HB zaznamenány ani u C ani u R linie. K proměnlivosti v projevu HB pravděpodobně dochází kvůli genetickým odlišnostem mezi hostiteli, symbionty nebo podílem obou. Identické sekvence genů *wsp* a *ftsZ* bakterie *Wolbachia* u R a C populace (Vala et al. 2002), stejně jako identické sekvence *wsp* genů srovnávané u tří populací (Perrot-Minnot et al. 2002), nahrávají teorii, že v proměnlivosti projevu HB hraje zásadní roli genotyp hostitele.

Na druhou stranu bakterie *Wolbachia* se může snažit zabránit křížení jedinců z odlišných populací pomocí obousměrné inkompatibility mezi různými druhy. Tak je tomu např.: u různých druhů parazitických vosiček *Nasonia*, které obsahují odlišné linie bakterie *Wolbachia* (Breeuwer & Werren 1990, Breeuwer & Werren 1992). Bakterie *Wolbachia* u těchto vosiček způsobí produkci výlučně samčího potomstva (Breeuwer & Werren 1990). Po přeléčení antibiotiky je mezidruhové křížení kompatibilní a je produkováno hybridní potomstvo (Breeuwer & Werren 1992). Za hybridní potomstvo jsou považovány samice, protože samci se u těchto haplodiploidních druhů vyvíjejí partenogeneticky (Breeuwer & Werren 1995). Odstranění bakterie *Wolbachia* umožnilo studium jevu selhání hybridů projevující se vysokou úmrtností samců F2 generace, který byl zaznamenán po antibiotické léčbě (Breeuwer & Werren 1995). Ze studie Breeuwer & Werren (1995) vyplývá, že na HB se podílí i jaderné a dědičné cytoplazmatické faktory.

Na efektu HB se pravděpodobně podílí celá řada faktorů od ekologických (Nosil et al. 2002) po genetické (Ting et al. 1998). Důležité je proto určit, zda má zásadní vliv hostitel, endosymbiont nebo interakce mezi nimi. Výzkum tohoto fenoménu komplikuje i skutečnost, že u celé řady studií byla zkoumána pouze F1 generace kříženého páru a efekt HB nemusel být tudíž vůbec prokázán. Bylo by proto vhodné výzkum zaměřit i na další generace (Vala et al. 2000).

3.2.2.2. Cytoplazmatická inkompatibilita

V případě cytoplazmatické inkompatibility zkoumané u *Drosophila simulans* dochází u inkompatibilního páru se samcem nakaženým bakterií *Wolbachia* během anafáze mitózy k asynchronní kondenzaci a segregaci otcovských chromozomů. Některé sesterské chromatidy se během anafáze přemístí k protějšímu pólu, ale zbývající zůstanou v ekvatoriální rovině a nedokončí cyklus, což se projeví vznikem aneuploidních či haploidních jader (Callaini et al. 1997). Následkem bude úbytek diploidních jedinců. Pokud by tento mechanismus fungoval i u haplodiploidních druhů roztočů, dala by se jím vysvětlit produkce výlučně samčího potomstva či dominance samčího poměru pohlaví v případě inkompatibilních křížení, protože samci jsou u tohoto způsobu rozmnožování haploidní (Vala et al. 2000).

Cytoplazmatickou inkompatibilitu způsobenou bakterií *Wolbachia* můžeme u haplodiploidních druhů rozdělit na dva druhy. První bývá označován jako „male development“ (dále MD) (Bordenstein et al. 2003, Vavre et al. 2001), kdy se z důvodu ztráty otcovských chromozomů oplozená vajíčka mění z diploidních na haploidní a vyvíjejí se z nich samci (Breeuwer & Werren 1990). V případě inkompatibilního křížení dochází k produkci výlučně samčího potomstva a nedochází k mortalitě (Perrot-Minnot et al. 1996). Druhým typem je tzv. „female mortality“ (dále FM), kdy dochází ke zvýšení mortality oplozených vajíček v případě inkompatibilního křížení (Bordenstein et al. 2003, Breeuwer 1997, Perrot-Minnot et al. 2002, Vavre et al. 2001).

Sviluška chmelová (*Tetranychus urticae*) C. L. Koch, 1836 a *T. turkestanii* Ugarov & Nikolskii, 1937 (Prostigmata: Tetranychidae)

Při křížení inkompatibilního páru roztoče svilušky chmelové, tj. samce nakaženého bakterií *Wolbachia* a nenakažené samice, byl zaznamenán FM projev CI, jenž byl manifestován výraznou mortalitou samičích potomků (Breeuwer 1997, Gotoh et al. 2003,

Gotoh et al. 2007b). Na rozdíl od MD typu CI je u roztoče svilušky chmelové ztráta otcovského chromozomu nekompletní a vede k produkci aneuploidních embryí (Breeuwer 1997). Mortalitu a neúplnou ztrátu otcovského chromozomu zdůvodňuje Breeuwer (1997) nízkou populační hustotou bakterií a přítomností holocentrických či holokinetických chromozomů, které nemají centromeru a mohou se pomocí mikrotubulů přichytit kdekoli na chromozomu, což zvyšuje pravděpodobnost vzniku aneuploidních embryí (Breeuwer & Werren 1993a, Tempelaar 1979 v Breeuwer 1997). Za FM CI můžeme označit i projev u inkompatibilního křížení roztoče *Tetranychus turkestanii*, kde taktéž došlo k výraznému poklesu samičích potomků (Breeuwer 1997). Podle Vavre et al. (2000) a Bordenstein et al. (2003) však fenotyp FM nesouvisí s holocentrickými chromozomy, ale je vlastností objevující se u haplodiploidních druhů a MD fenotyp je výjimkou.

V obdobném experimentu (Vala et al. 2000) prokázali u roztoče svilušky chmelové projev částečné CI u R populace, kdy u inkompatibilního páru došlo k nárůstu samčího potomstva a zvýšení poměru pohlaví ve prospěch samců, mortalita však změněna nebyla. Tyto výsledky vedou k závěru, že zde došlo k CI MD typu a že je možné u roztočů dosáhnout haploidizace diploidních vajíček. Nicméně haploidizace nebyla pravděpodobně dokončena a fragmenty otcovských chromozomů umožnily vznik aneuploidních samic. Ty však kvůli chybějícímu otcovskému chromozomu nemohou produkovat životaschopné potomstvo a dochází k stejnému projevu jako selhání hybridů. Pro potvrzení této hypotézy je nutno použít cytologické analýzy (Vala et al. 2000). U R populace Vala et al. (2002) však následně pozorovali silný projev CI vyznačující se vysokou mortalitou a dominancí samčího potomstva lišící se od prvního experimentu, jenž Vala et al. (2002) vysvětlují na hypotéze, podle které může mít na projev CI vliv hostitel.

Sviluška pasaniová (*Oligonychus gotohi*) Ehara, 1999; sviluška morušová (*Panonychus mori*) Yokoyama, 1929; sviluška chmelová (*Tetranychus urticae*) C. L. Koch, 1836 (Prostigmata: Tetranychidae)

V Japonsku byly u 3/6 zkoumaných roztočů nakažených bakterií *Wolbachia* zaznamenán projev CI, ale objevily se i případy roztočů, které projev CI vůbec nevykazovaly. U svilušky pasaniové a dvou forem roztoče svilušky chmelové došlo k projevu FM CI (Gotoh et al. 2003, Gotoh et al. 2007b). U svilušky morušové se oproti tomu projevil MD typ CI (Gotoh et al. 2003). U zbývajících druhů roztočů *Tetranychus kanzawai* Kishida, 1928; sviluška puerariová (*T. parakanzawai*) Ehara, 1999 a *T. pueraricola* Ehara & Gotoh, 1996 (Prostigmata: Tetranychidae) nebyly zaznamenány žádné projevy CI stejně jako u populací

svilušky chmelové a svilušky pasaniové z odlišných stanovišť (Gomi et al. 1997, Gotoh et al. 1999, Gotoh et al. 2003).

Uvedená proměnlivost v projevu CI může být zapříčiněna několika faktory. Prostým vysvětlením by byla existence dvojího typu linií bakterie *Wolbachia*, tedy linií způsobujících CI a linií neschopných projevu CI (Hoffmann et al. 1996). Tomuto tvrzení však odporují identické *wsp* sekvence genů bakterií *Wolbachia* nalézající se u svilušky morušové s projevem CI a svilušky chmelové a *T. kanzawai*, u kterých nebyla CI zaznamenána. Dalším důvodem, který může vyloučit, je bakteriální hustota (Noda et al. 2001, Ikeda et al. 2003). Ta byla u zmíněných tří druhů na podobné úrovni (Gotoh et al. 2003). Na proměnlivosti efektu CI se u svilušky morušové a svilušky chmelové a *T. kanzawai* nejpravděpodobněji podílel genotyp hostitele (Perrot-Minnot et al. 2002, Jiggins et al. 2002, Gotoh et al. 2003, Gotoh et al. 2007b). Není vyloučeno, že svůj podíl na projevu CI však může mít i věk hostitele (Kittayapong et al. 2002).

Zmíněné rozdělení CI na dva druhy však může představovat pouze dva extrémy, ke kterým může dojít, jak Vavre et al. (2001) interpretoval u parazitoidu *Leptopilina heterotoma* (Thomson, 1862) (Hymenoptera: Eucilidae). Ten vykazoval smíšený fenotyp s projevy jak MD, tak FM (Vavre et al. 2001). Nelze zatím jednoznačně určit, jestli na míru projevu CI má majoritní vliv populační hustota symbionta (Boyle et al. 1993, Bourtzis et al. 1996), genetické pozadí hostitele či symbionta nebo interakce mezi nimi (Clancy & Hoffmann 1996, Breeuwer & Werren 1993b, Hoffmann et al. 1996, Clancy & Hoffmann 1997, Giordano et al. 1997).

Proměnlivost projevu CI u *T. urticae*

Ve studii Perrot-Minnot et al. (2002) u roztoče svilušky chmelové proměnlivost kolísá od žádného projevu po úplnou CI vyznačující se pouze samčím potomstvem, tedy cytoplazmatická inkompatibilita MD typu. Ač má tento roztoč holocentrické chromozomy, haploidizace diploidních vajíček je způsobena ztrátou otcovských chromozomů nebo jejich fragmenty se zeslabenou produkcí aneuploidních embryí se stejným výsledným fenotypem. Pro potvrzení jedné z variant je nutná podrobnější cytologická analýza (Perrot-Minnot et al. 2002). U roztoče *T. turkestan* nebyl na rozdíl od výsledků Breeuwer (1997) pozorován žádný projev CI.

Zmíněná proměnlivost mezi projevy CI je podle Perrot-Minnot et al. (2002) přisuzována spíše efektu hostitele než symbionta, protože sekvence *wsp* genů bakterií *Wolbachia* se u třech zkoumaných populací od sebe nelišily, i když vykazovaly odlišný

fenotyp. Míra projevu CI může být ovlivněna i populační hustotou bakterie *Wolbachia* (Breeuwer & Werren 1993a), nižší bakteriální hustota samce oproti samici působí slabší úroveň CI (částečná) zatímco u vyšší bakteriální hustoty je častěji pozorován silnější projev CI (úplná) (Breeuwer & Werren 1993a, Perrot-Minnot & Werren 1999). Navíc u haplodiploidních druhů vyšší bakteriální hustota působí spíše MD typ CI a nižší spíše FM typ CI (Breeuwer 1997, Breeuwer & Werren 1993a, Perrot-Minnot et al. 2002, Vavre et al. 2001). Bakteriální hustota pravděpodobně určuje úspěšnost modifikace spermie, která vede k různému stupni fragmentace otcovských chromozomů a tedy různé míře vzniku aneuploidních jader, což odpovídá pozorovanému vysokému projevu CI MD typu v experimentu (Perrot-Minnot et al. 2002).

Samičí volba partnera

Cytoplazmatická inkompatibilita je jev, který je výhodný pouze pro parazita, oproti tomu hostiteli škodí. V případě inkompatibilního křížení dochází ke snížení fitness infikovaných samců poklesem jejich potomstva. Ač bakterie *Wolbachia* není samci přenášena skrz inkompatibilní křížení, podle Hurst (1991) poklesem potomstva snižuje kompetici a zvyšuje fitness samic obsahujících bakterii *Wolbachia*. Pozoruhodným objevem je skutečnost, že hostitel se určitým způsobem dokáže bránit manipulaci bakterie *Wolbachia* s jeho reprodukcí. Podle Møller et al. (1999) hrají parazité důležitou roli v pohlavním výběru a volba partnera může záviset na jeho infekčním statutu.

Vala et al. (2004) prokázal, že sviluška chmelová je schopná vyhnout se inkompatibilnímu křížení, tj. infikovaný samec s neinfikovanou samicí. Neinfikované samice si přednostně vybírají nenakažené samce. Oproti tomu infikované samice se páří jak s infikovanými, tak s neinfikovanými samci. Všechny tyto kombinace vedou ke kompatibilním křížením (Vala et al. 2004). Oproti tomu de Crespigny & Wedell (2007) při obdobném experimentu s *Drosophila simulans* a octomilkou obecnou neprokázali vliv infekčního statutu na výběr partnera. Pro objasnění této problematiky je zapotřebí dalšího výzkumu.

V případě správnosti dané hypotézy ovšem vyvstává otázka, proč ještě nedošlo k vymizení CI. Jednou z možností je skutečnost, že k vymizení CI dochází. Pro ověření této domněnky však chybí dostatek dat o frekvenci rozšíření CI způsobené bakterií *Wolbachia* v populaci roztočů. Dalším vysvětlením může být udržení CI pomocí pozitivní selekce jako výhoda infikovaného hostitele (Vala et al. 2004).

3.2.2.3. Plodnost

Další nevýhodou pro roztoče infikované bakterií *Wolbachia* je ovlivnění jejich plodnosti. Vala et al. (2000) zaznamenal o 10 % nižší snůšky infikovaných samic ve srovnání s neinfikovanými samicemi v případě roztoče svlušky chmelové (Vala et al. 2000). Podobného výsledku dosáhla Perrot-Minnot et al. (2002), kde bylo dosaženo ještě silnějšího poklesu plodnosti u roztoče svlušky chmelové. Plodnost infikovaných samic byla v prvním týdnu snížena o 80 – 100 % ve srovnání se samicemi léčenými antibiotiky. V dalších 15 generacích byl zaznamenáván nárůst plodnosti léčených samic až na 28 – 50 % (Perrot-Minnot et al. 2002).

Mechanismus bakterie *Wolbachia* ovlivňující plodnost roztočů není v současné době znám. Jednou z možností je schopnost bakterie *Wolbachia* zamezit kladení vajec samic, které je antibiotickou léčbou obnoveno. Dalším vysvětlením může být role bakterie *Wolbachia* v potlačení fenotypického projevu jaderných genů hostitele. Léčbou pomocí antibiotik dochází k obnovení změn epigenetického charakteru. Bakterie *Wolbachia* však mohla působit i dědičné změny plodnosti, jež mohly být odkryty až dlouhodobou léčbou antibiotiky, jak tomu bylo u pozorování 15 generací po dobu 9 měsíců (Perrot-Minnot et al. 2002).

Ke snížení plodnosti bakterií *Wolbachia* dochází i u *Drosophila simulans* (Hoffmann & Turelli 1988, Hoffmann et al. 1990). Na druhou stranu u *Drosophila simulans* (Hoffmann et al. 1996, Poinot & Merçot 1997) a *Nasonia vitripennis* plodnost ovlivněna nebyla (Bordenstein & Werren 2000). Pro udržení a šíření bakterie *Wolbachia* v populaci je nevýhodné snižovat plodnost samic, jež jsou klíčové pro přenos těchto bakterií, proto je nutno podrobit tento faktor dalšímu výzkumu (Perrot-Minnot et al. 2002).

3.2.2.4. Partenogeneze

Bakterie *Wolbachia* je přenášena vertikálně, tj. z matky na potomstvo. Z tohoto hlediska je pro ni extrémně výhodné působit partenogenezi, kdy dochází k produkci výlučně samičího nakaženého potomstva. Samci jsou pro bakterii *Wolbachia* vlastně „odpadem“, protože přes ně není přenášena (Stouthamer et al. 1999).

Podle Oliver (1971) se řada druhů podčeledi Bryobiinae rozmnožuje thelytokní partenogenezí. Při tomto způsobu reprodukce se samci objevují zřídka nebo zcela chybí (Pijnacker et al. 1981 v Weeks et al. 2001). Weeks & Breeuwer (2001) prokázali, že bakterie *Wolbachia* je původcem thelytokní partenogeneze u dvou druhů rodu *Bryobia*.

Druhy zkoumané Weeks & Breeuwer (2001) svluška břechťanová (*Bryobia kissophila*) van Eyndhoven, 1955; svluška rybízová (*B. praetiosa*) C. L. Koch, 1836; svluška hřebenová

(*B. graminum*) Schrank, 1781; sviluška jabloňová (*B. rubrioculuss* Scheuten, 1857) a *B. neopraetiosa* Meyer, 1974 se rozmnožují thelytokní partenogenezí, jedinci šestého druhu rodu *Bryobia* nebyli taxonomicky rozpoznáni (Norton et al. 1993 v Weeks & Breeuwer 2001). Ve všech těchto druzích byla detekována bakterie *Wolbachia*. *B. praetiosa* a neidentifikovaný druh rodu *Bryobia* byly podrobeny antibiotické léčbě. Při následné reprodukci došlo u obou druhů k produkci samčího potomstva dosahující 50 % ve srovnání s nulovým výskytem samců před léčbou antibiotiky (Weeks & Breeuwer 2001).

V případě haplodiploidního určení pohlaví rodu *Bryobia* by však po antibiotické léčbě měla následovat 100 % produkce samčích potomků. Vysvětlení spočívá v nedokonalosti antibiotické léčby, kdy je bakterie *Wolbachia* částečně přenášena do samčího potomstva. Potomstvo testované na přítomnost bakterie *Wolbachia* vykazovalo neinfikované syny a infikované dcery (Weeks & Breeuwer 2001).

Mechanismus bakterie *Wolbachia* působící partenogenezi u *B. praetiosa* je značně odlišný od mechanismu zaznamenaného u hmyzu. V případě *B. praetiosa* používá bakterie *Wolbachia* apomiktický způsob vedoucí k diploidním gametám, kdy je potomstvo geneticky identické s matkou (Weeks & Breeuwer 2001). Oproti tomu u *Trichogramma* sp. Westwood, 1833 (Hymenoptera: Trichogrammatidae) a *Leptopilina clavipes* (Hartig, 1841) (Hymenoptera: Figitidae) dochází v anafázi prvního mitotického dělení k duplikaci gamet, vzniku jádra s dvěma identickými chromosomy a tím navození diploidie (Stouthamer & Kazmer 1994, Pannebakker et al. 2004). Jiný mechanismus byl zaznamenán u *Muscidifurax raptorellus* Kogan & Legner, 1970 (Hymenoptera: Pteromalidae) a žlabatky růžové (*Diplolepis rosae* Linnaeus, 1758) (Hymenoptera: Cynipidae), kde se v druhé profázi dvě jádra dále nedělí, ale dojde k jejich fúzi (Gottlieb et al. 2002, Stille & Dävring 1980).

Ač spolu samci a samice F1 generace kopulovali, nedošlo k oplození. Kopulace infikovaných samic s neinfikovanými samci vyústila v produkci výlučně samčího potomstva, které vykazovalo genotyp matky a u potomstva nebyla zaznamenána ani rekombinace. Sviluška rybízová pravděpodobně není schopná pohlavního rozmnožování, ale pro potvrzení tohoto závěru je zapotřebí dalšího výzkumu (Weeks & Breeuwer 2001). Jednou z možností vysvětlujících úpadek pohlavního rozmnožování může být postupný pokles účinku pohlavního výběru (Pijls et al. 1996). Jednou z příčin však může být i mechanismus bakterie *Wolbachia*, který mohl zabránit meióze a tím i pohlavnímu rozmnožování. Důvodem může být i rozdílnost linií roztočů *Bryobia* (Weeks & Breeuwer 2001).

Můžeme předpokládat, že u dalších čtyř zmíněných druhů se bakterie *Wolbachia* také podílí na způsobení thelytokní partenogeneze. Bylo by vhodné další výzkum zaměřit

i na ostatní druhy rodu *Bryobia*, jež se rozmnožují thelytokní partenogenezí, a zjistit, jestli je bakterie *Wolbachia* původcem radiace tohoto rodu (Weeks & Breeuwer 2001).

3.3. Dvojnásobné infekce (Double infections)

3.3.1. Vlivy bakterií *Cardinium* a *Wolbachia* na fenotyp hostitele

3.3.1.1. Cytoplazmatická inkompatibilita

U roztočů *Tetranychus phaselus* Ehara, 1960; *T. truncates* Ehara, 1956 a sviluška Piercova (Prostigmata: Tetranychidae) byla prokázána dvojitá infekce, tj. infekce bakteriemi *Cardinium* i *Wolbachia*, která u nekompatibilních párů, tj. neinfikovaných samic a dvojitě infikovaných samců, způsobila CI. (Zhao et al. 2013a, Zhao et al. 2013b, Zhu et al. 2012).

V případě svilušky Piercovy byli navíc roztoči vystaveni vysoké teplotě pro eliminování bakterie *Wolbachia* a přeléčení antibiotiky pro získání roztočů infikovaných pouze bakterií *Wolbachia*. Srovnáním nově vzniklých nekompatibilních párů, tj. neinfikovaných samic a samců infikovaných bakteriemi *Cardinium*, *Wolbachia* a dvojitě infikovaných samců, bylo zjištěno, že *Wolbachia* způsobuje CI na nízké úrovni (32 %). Oproti tomu *Cardinium* vykazovalo silný projev CI (61,9 %) a v případě dvojitě infekce byl zaznamenán projev ještě silnější (88,5 %) (Zhu et al. 2012). Oproti tomu výsledky Ros & Breeuwer (2009) u *B. sarothamni* neprokázaly, že by křížení neinfikované samice a samce nakaženého bakterií *Wolbachia* nebo dvojitě infikovaného samce způsobovala CI. To lze vysvětlit odlišným genotypem hostitele, již zmíněnými rozdíly v liniích bakterií či různou mírou ovlivnění projevu bakteriální infekce hostitelem (Bordestein et al. 2003, McGraw et al. 2001, Stouthamer et al. 1999, Weeks et al. 2002). Dalším důvodem pro absenci CI u *B. sarothamni* může být modifikační systém bakterie *Wolbachia* neschopný modifikace spermie, který může být fenotypicky nerozeznatelný od neinfikovaného hostitele (Charlat et al. 2001, Vala et al. 2002, Zabalou et al. 2004b).

Bakterie *Wolbachia* posiluje CI způsobené bakterií *Cardinium*

Pozoruhodnou skutečností je vliv bakterie *Wolbachia* na sílu CI způsobené bakterií *Cardinium*. Srovnáním křížení neinfikované samice a samce infikovaného bakterií *Cardinium* (60,9 %), samice infikované bakterií *Wolbachia* a samce infikovaného bakterií *Cardinium* (61,9 %) a samice nakažené bakterií *Wolbachia* a dvojitě infikovaného samce (80 %) bylo zjištěno, že počet potracených vajíček je v případě přítomnosti bakterie *Wolbachia* v obou

jedincích páru znatelně vyšší než v ostatních uvedených kříženích. Pokud je *Wolbachia* přítomna v samici i samci, posiluje CI způsobené bakterií *Cardinium* (Zhu et al. 2012). Ros & Breeuwer (2009) provádějící stejná křížení u *B. sarothamni* však došli k rozdílným výsledkům v případě samice nakažené bakterií *Wolbachia* a dvojitě infikovaného samce, kdy nebyl zaznamenán projev CI (6,6 % potracených vajíček). Provedením stejného experimentu pro bakterii *Cardinium* bylo dokázáno, že *Cardinium* neovlivňuje sílu CI způsobenou bakterií *Wolbachia*, hodnoty potracených vajíček u těchto křížení nevykazovaly signifikantní rozdíly (Zhu et al. 2012).

Modificcation-rescue model

Podle Zhu et al. (2012) *Wolbachia* neovlivňuje „záchranu“ CI způsobenou bakterií *Cardinium* a *Cardinium* neovlivňuje „záchranu“ CI způsobenou bakterií *Wolbachia*. V případě křížení dvojitě nakažené samice a samce nakaženého bakterií *Cardinium* byla modifikace „zachráněna“ a nedošlo k CI (Zhu et al. 2012). Tento výsledek je značně odlišný od výsledků experimentu Ros & Breeuwer (2009), kde v případě stejného křížení u *B. sarothamni* došlo k silnému projevu CI.

Rozdíly ve výsledcích dvojité infekce samic Zhu et al. (2012) a Ros & Breeuwer (2009) můžeme vysvětlit podobností linií bakterie *Cardinium* u svilušky Piercovy. Je pravděpodobné, že disponovaly stejnými modification-rescue systémy, mohlo tedy dojít k „záchraně“ a nebyla zaznamenána CI. Další vysvětlení může být spojeno s použitím různých metod. Zhu et al. (2012) využili k vytvoření jednotlivě nakažených linií metodu heat-treatment a léčbu antibiotiky, oproti tomu Ros & Breeuwer (2009) použili přirozeně nakažené roztoče. Ve hře tedy může být ještě třetí mikroorganismus ovlivňující CI, jenž byl antibiotiky nebo pomocí vysoké teploty eliminován, a v případě přirozené nákazy se podílel na vyvolání projevu CI.

3.3.1.2. Plodnost

V případě křížení dvojitě infikované samice a neinfikovaného samce u *T. phaselus* a *T. truncates* došlo ke zvýšené plodnosti ve srovnání s neinfikovaným párem. Oproti tomu v kříženích, kde byl dvojitě infikován samec, byla plodnost snížena (Zhao et al. 2013a, Zhao et al. 2013b).

Reprodukce roztočů *T. truncates* je ovlivněna hustotou přítomných bakterií. Při křížení neinfikovaných roztočů s infikovanými dochází ke zvýšení hustoty bakterií *Wolbachia*

a *Cardinium*. Oproti tomu při křížení infikovaného páru byl naměřen pokles hustoty obou bakterií (Zhao et al. 2013a).

Z výsledků křížení neinfikovaných samců s dvojité infikovanými samicemi vyznačující se zvýšenou plodností a hustotou bakterií můžeme usoudit, že se jedná o snahu udržet a rozšířit výskyt bakteriální populace (Zhao et al. 2013a, Zhao et al. 2013b). Naopak u křížení neinfikované samice a dvojité infikovaného samce dochází k nárůstu hustot bakterií kvůli zesílení projevu CI (Zhao et al. 2013a).

3.4. Násobné infekce (Multiple infections)

U *Tetranychus phaselus* (Prostigmata: Tetranychidae) se setkáváme nejen s dvojitou infekcí, ale i s tzv. superinfekcí, kdy je roztoč nakažen několika liniemi bakterie. Do zkoumaného souboru byli zahrnuti nenakažení, dvojité infikovaní, tj. bakterií *Cardinium* a linií bakterie *Wolbachia* wCon, a násobně infikovaní roztoči, tj. bakterií *Cardinium* a liniemi bakterie *Wolbachia* wCon a wOri. Roztoči byli získáni přirozenou cestou, bez použití antibiotik (Zhao et al. 2013b).

3.4.1. Vlivy bakterií *Cardinium* a *Wolbachia* na fenotyp hostitele

3.4.1.1. Cytoplazmatická inkompatibilita

V případě křížení neinfikované samice a dvojité infikovaného nebo násobně infikovaného samce byl zaznamenán silný projev CI vyznačující se nižší líhivostí a změnou poměru pohlaví ve prospěch samčího. Na tomto projevu se však nepodílí linie wOri, protože v křížení mnohonásobně infikovaného samce s dvojitě infikovanou samicí nedošlo k projevu CI. Linie wOri je oproti linii wCon a bakterii *Cardinium* přítomna ve velmi nízkých hustotách, což může být důvodem absence projevu CI (Zhao et al. 2013b).

3.4.1.2. Plodnost

Ze srovnání plodnosti všech křížení lze vyvodit, že neinfikovaní samci zvyšují plodnost násobně infikovaných samic, ale s dvojitě infikovanými samci dochází ke snížení plodnosti samic, protože dvojité infikovaní samci se snaží zabránit rozšíření násobné infekce, což můžeme označit jako kompetici bakterií dvojité a násobně infikovaných roztočů. Dále bylo zjištěno, že dvojité i násobně infikovaní samci snižují plodnost neinfikovaných samic (Zhao et al. 2013b).

Hustota

Na základě porovnání hustot bakterií bylo zjištěno, že bakterie linie wOri jsou v násobně infikovaných roztočích přítomny v nízkých hustotách oproti bakteriím linie wCon a bakteriím *Cardinium*. Hustoty bakterií linie wCon a bakterie *Cardinium* se liší v závislosti na stáří samice. U samic starých 4 dny byly naměřeny vyšší hodnoty ve dvojité infikovaných roztočích než v násobně infikovaných, protože linie wOri omezuje hustoty linie wCon a bakterie *Cardinium* z důvodu nízké dostupnosti živin v mladých hostitelích. Oproti tomu v samicích starších 4 dny byly zaznamenány vyšší hodnoty v násobně infikovaných. Linie wOri zde podpořila zvýšení hustoty linie wCon a bakterie *Cardinium* a tím napomohla přenosu více bakterií do potomků v násobně infikovaných roztočích (Zhao et al. 2013b).

3.4.1.3. Životnost

Linie wOri neovlivňuje pouze hustoty bakterií, ale podílí se i na prodloužení života násobně infikovaných samic. Ve srovnání s neinfikovanými a dvojité infikovanými se násobně infikované samice dožívají vyššího věku, linie wOri se díky delší životnosti samice rozšíří do více potomků a udržuje se tak déle v populaci. V případě inkompatibilního páru má však násobně infikovaný samec tendenci snižovat životnost neinfikovaných samců, což se spolu s již zmiňovanou schopností snížení plodnosti jeví jako nová, neobvyklá a velmi účinná zbraň pro snižování počtu neinfikovaných samic a podporu šíření infekce (Zhao et al. 2013b).

4. Závěr

Bakterie *Cardinium hertigii* a *Wolbachia pipientis* jsou nepříbuzné bakterie. Bakterie *Cardinium* patří do řádu Sphingobacteriales a bakterie *Wolbachia* do řádu Rickettsiales. Liší se morfologicky ve velikosti, tvaru i přítomností charakteristických struktur. Bakterie *Cardinium* nabývá větších rozměrů, její tvar se se různí od oválného či elipsového až do protáhlého klobásovitého tvaru a objevují se u ní ultrastruktury podobné mikrofilamentům nebo tubulům (Microtubule-like-structures, MLs). Oproti tomu bakterie *Wolbachia* je menší, nabývá tyčinkovitého nebo kokoidního tvaru a nachází se v trojvrstvých váčcích, kdy nejsvrchnější membrána pochází od hostitele, na rozdíl od bakterie *Cardinium*, která se pohybuje volně v cytoplazmě hostitele. Odlišnost v případě lokalizace je obtížně

srovnatelná vzhledem k nízkému počtu prací zabývajících se touto problematikou. V případě bakterie *Cardinium* byla bakterie detekována v každé části těla hostitele roztoče *Brevipalpus*. Na druhou stranu obě bakterie byly nalezeny v tkáních reprodukčního ústrojí roztoče a tkáních střeva roztoče svilušky *Piercovy*. Bylo by vhodné budoucí výzkum zaměřit na lokalizaci obou bakterií v roztočích.

Bakterie se také liší ve škále způsobů manipulace s hostitelem, kdy bakterie *Cardinium* navozuje u hostitelů pouze feminizaci a CI. Bakterie *Wolbachia* je schopná kromě CI způsobit partenogenezi, selhání hybridů či ovlivnit plodnost hostitele. V případě dvojitých infekcí bylo zaznamenáno CI a ovlivnění plodnosti hostitele, u násobných infekcí kromě CI a ovlivnění plodnosti ještě ovlivnění životnosti hostitele. Pozoruhodné je, že interakce působené bakterií *Wolbachia* byly zaznamenány pouze u taxonu Tetranychidae, oproti tomu bakterie *Cardinium* manipulovala s reprodukcí širšího spektra roztočů, což svědčí pro vyšší výskyt bakterie *Cardinium* v roztočích ve srovnání s bakterií *Wolbachia*. Odhalení způsobů manipulace těchto bakterií s roztoči může napomoci k vytvoření modelu sledujícího interakce symbiotická/parazitická bakterie s členovci, který najde využití v mikrobiologii, ekologii a evoluční biologii.

Výzkum reprodukčních parazitů *Cardinium* a *Wolbachia* může mít důležitou úlohu v biologické kontrole škůdců, což předpokládají studie Zabalou et al. 2004a a Bourtzis 2008. Potenciál vidím v infikování samců škůdců svilušek (Tetranychidae) těmito bakteriemi a následné indukci CI, což může být využito jako účinný prostředek biologického boje. Využití CI v kontrole škůdců bylo úspěšně laboratorně testováno Zabalou et al. (2004a) u populací vrtule velkohlavé (*Ceratitis capitata*) (Diptera: Tephritidae).

5. Seznam zkratk

CI	Cytoplazmatická inkompatibilita
ES	Elektrodenzní struktury, složka MLC
FEP	Fibrózní elektrodenzní vrstva, složka MLC
FM	Female mortality typ cytoplazmatické inkompatibility
HB	Selhání hybridů (Hybrid breakdown)
MD	Male development typ cytoplazmatické inkompatibility
MLC	Komplex obsahující mikrotubulům podobné elementy
MLs	Struktury podobné mikrotubulům, složka MLC (Microtubule like structures)

6. Literatura

* označené sekundární citace

Baldo, L., Prendini, L., Corthals, A. & Werren, J. (2007). Wolbachia are present in Southern African scorpions and cluster with supergroup F. *Current Microbiology* **55**, 367-373.

Bigliardi, E., Sacchi, L., Genchi, M., Alma, A., Pajoro, M., Daffonchio, D., Marzorati, M. & Avanzati, A. M. (2006). Ultrastructure of a novel Cardinium sp. symbiont in *Scaphoideus titanus* (Hemiptera: Cicadellidae). *Tissue Cell* **38**, 257-261.

Bordenstein, S. R. & Werren, J. H. (2000). Do Wolbachia influence fecundity in *Nasonia vitripennis*? *Heredity (Edinb)* **84** (Pt 1), 54-62.

Bordenstein, S., Uy, J. & Werren, J. (2003). Host genotype determines cytoplasmic incompatibility type in the haplodiploid genus *Nasonia*. *Genetics* **164**, 223-233.

Bordenstein, S. & Rosengaus, R. B. (2005). Discovery of a novel Wolbachia super group in Isoptera. *Curr Microbiol* **51**, 393-398.

Bourtzis, K. (2008). Wolbachia-based technologies for insect pest population control. *Adv Exp Med Biol* **627**, 104-113.

Bourtzis, K., Nirgianaki, A., Markakis, G. & Savakis, C. (1996). Wolbachia infection and cytoplasmic incompatibility in *Drosophila* species. *Genetics* **144**, 1063-1073.

Boyle, L., O'Neill, S. L., Robertson, H. M. & Karr, T. L. (1993). Interspecific and intraspecific horizontal transfer of Wolbachia in *Drosophila*. *Science* **260**, 1796-1799.

Breeuwer, J. (1997). Wolbachia and cytoplasmic incompatibility in the spider mites *Tetranychus urticae* and *T. turkestanii*. *Heredity* **79**, 41-47.

Breeuwer, J. A. & Werren, J. H. (1990). Microorganisms associated with chromosome destruction and reproductive isolation between two insect species. *Nature* **346**, 558-560.

Breeuwer, J. & Werren, J. (1993a). Cytoplasmic incompatibility and bacterial density in *Nasonia vitripennis*. *Genetics* **135**, 565-574.

Breeuwer, J. & Werren, J. (1993b). Effect of genotype on cytoplasmic incompatibility between 2 species of *Nasonia*. *Heredity* **70**, 428-436.

Breeuwer J. & Werren, J. (1995). Hybrid breakdown between 2 haplodiploid species – the role of nuclear and cytoplasmic genes. *Evolution* **49**, 705-717.

Breeuwer, J. A., Stouthamer, R., Barns, S. M., Pelletier, D. A., Weisburg, W. G. & Werren, J. H. (1992). Phylogeny of cytoplasmic incompatibility micro-organisms in the parasitoid wasp genus *Nasonia* (Hymenoptera: Pteromalidae) based on 16S ribosomal DNA sequences. *Insect Mol Biol* **1**, 25-36.

Burton, R., Ellison, C. & Harrison, J. (2006). The sorry state of F-2 hybrids: Consequences of rapid mitochondrial DNA evolution in allopatric populations. *American Naturalist* **168**, S14-S24.

- Callaini, G., Riparbelli, M. G. & Dallai, R. (1994).** The distribution of cytoplasmic bacteria in the early *Drosophila* embryo is mediated by astral microtubules. *J Cell Sci* **107** (Pt 3), 673-682.
- Callaini, G., Dallai, R. & Riparbelli, M. (1997).** Wolbachia-induced delay of paternal chromatin condensation does not prevent maternal chromosomes from entering anaphase in incompatible crosses of *Drosophila simulans*. *Journal of Cell Science* **110**, 271-280.
- Chang, K. P. & Musgrave, A. J. (1972).** Multiple symbiosis in a leafhopper, *Heliochara communis* Fitch (Cicadellidae: Homoptera): envelopes, nucleoids and inclusions of the symbiotes. *J Cell Sci* **11**, 275-293.
- Charlat, S., Calmet, C. & Mercot, H. (2001).** On the mod resc model and the evolution of Wolbachia compatibility types. *Genetics* **159**, 1415-1422.
- Chen, W., Tsai, K., Cheng, S., Huang, C. & Wu, W. (2005).** Using in situ hybridization to detect endosymbiont Wolbachia in dissected tissues of mosquito host. *Journal of Medical Entomology* **42**, 120-124.
- Cheng, Q., Ruel, T., Zhou, W., Moloo, S., Majiwa, P., O'Neill, S. & Aksoy, S. (2000).** Tissue distribution and prevalence of Wolbachia infections in tsetse flies, *Glossina* spp. *Medical and Veterinary Entomology* **14**, 44-50.
- Chigira, A. & Miura, K. (2005).** Detection of 'candidatus Cardinium' bacteria from the haploid host *Brevipalpus californicus* (Acari: Tenuipalpidae) and effect on the host. *Exp Appl Acarol* **37**, 107-116.
- Cho, K. O., Kim, G. W. & Lee, O. K. (2011).** Wolbachia bacteria reside in host Golgi-related vesicles whose position is regulated by polarity proteins. *PLoS One* **6**, e22703.
- Clancy, D. J. & Hoffmann, A. A. (1996).** Cytoplasmic incompatibility in *Drosophila simulans*: evolving complexity. *Trends Ecol Evol* **11**, 145-146.
- Clancy, D. J. & Hoffmann, A. A. (1997).** Behavior of Wolbachia endosymbionts from *Drosophila simulans* in *Drosophila serrata*, a novel host. *Am Nat* **149**, 975-988.
- Clark, M., Anderson, C., Cande, J. & Karr, T. (2005).** Widespread prevalence of Wolbachia in laboratory stocks and the implications for *Drosophila* research. *Genetics* **170**, 1667-1675.
- Clark, M., Bailey-Jourdain, C., Ferree, P., England, S., Sullivan, W., Windsor, D. & Werren, J. (2008).** Wolbachia modification of sperm does not always require residence within developing sperm. *Heredity* **101**, 420-428.
- de Crespigny, F. & Wedell, N. (2007).** Mate preferences in *Drosophila* infected with Wolbachia? *Behavioral Ecology and Sociobiology* **61**, 1229-1235.
- Dieckmann, U. & Doebeli, M. (1999).** On the origin of species by sympatric speciation. *Nature* **400**, 354-357.
- Dobson, S., Bourtzis, K., Braig, H., Jones, B., Zhou, W., Rousset, F. & O'Neill, S. (1999).** Wolbachia infections are distributed throughout insect somatic and germ line tissues. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **29**, 153-160.
- Ellison, C., Niehuis, O. & Gadau, J. (2008).** Hybrid breakdown and mitochondrial dysfunction in hybrids of *Nasonia* parasitoid wasps. *Journal of Evolutionary Biology* **21**, 1844-1851.

- Frydman, H., Li, J., Robson, D. & Wieschaus, E. (2006).** Somatic stem cell niche tropism in *Wolbachia*. *Nature* **441**, 509-512.
- Giordano, R., Jackson, J. J. & Robertson, H. M. (1997).** The role of *Wolbachia* bacteria in reproductive incompatibilities and hybrid zones of *Diabrotica* beetles and *Gryllus* crickets. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 11439-11444.
- Gomi, K., Gotoh, T. & Noda, H. (1997).** *Wolbachia* having no effect on reproductive incompatibility in *Tetranychus kanzawai* KISHIDA (Acari: Tetranychidae). *Applied Entomology and Zoology* **32**, 485-490.
- Gotoh, T., Gomi, K. & Nagata, T. (1999).** Incompatibility and host plant differences among populations of *Tetranychus kanzawai* Kishida (Acari : Tetranychidae). *Applied Entomology and Zoology* **34**, 551-561.
- Gotoh, T., Noda, H. & Hong, X. (2003).** *Wolbachia* distribution and cytoplasmic incompatibility based on a survey of 42 spider mite species (Acari : Tetranychidae) in Japan. *Heredity* **91**, 208-216.
- Gotoh, T., Noda, H. & Ito, S. (2007a).** Cardinium symbionts cause cytoplasmic incompatibility in spider mites. *Heredity (Edinb)* **98**, 13-20.
- Gotoh, T., Sugawara, J., Noda, H. & Kitashima, Y. (2007b).** *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility in Japanese populations of *Tetranychus urticae* (Acari : Tetranychidae). *Experimental and Applied Acarology* **42**, 1-16.
- Gottlieb, Y., Zchori-Fein, E., Werren, J. & Karr, T. (2002).** Diploidy restoration in *Wolbachia*-infected *Muscidifurax uniraptor* (Hymenoptera : pteromalidae). *Journal of Invertebrate Pathology* **81**, 166-174.
- Groot, T. V. & Breeuwer, J. A. (2006).** Cardinium symbionts induce haploid thelytoky in most clones of three closely related *Brevipalpus* species. *Exp Appl Acarol* **39**, 257-271.
- * Helle, W., Bolland, H. R. & Heitmans, W. R. B. (1980).** Chromosomes and types of parthenogenesis in the false spider mites (Acari: Tenuipalpidae). *Genetica* **54**, 45-50.
- Hertig, M. (1936).** The Rickettsia, *Wolbachia pipientis* (gen. et sp.n.) and Associated Inclusions of the Mosquito, *Culex pipiens*. *Parasitology* **28**, 453-486.
- Hertig, M. & Wolbach, S. B. (1924).** Studies on Rickettsia-Like Micro-Organisms in Insects. *J Med Res* **44**, 329-374.327.
- Hilgenboecker, K., Hammerstein, P., Schlattmann, P., Telschow, A. & Werren, J. (2008).** How many species are infected with *Wolbachia*? - a statistical analysis of current data. *Fems Microbiology Letters* **281**, 215-220.
- Hoffmann, A. A., Turelli, M. & Simmons, G. M. (1986).** Unidirectional incompatibility between populations of *Drosophila simulans*. *Evolution*. **40**, 692-701
- Hoffmann, A. A., Turelli, M. & Harshman, L. G. (1990).** Factors affecting the distribution of cytoplasmic incompatibility in *Drosophila simulans*. *Genetics* **126**, 933-948.
- Hoffmann, A. & Turelli, M. (1988).** Unidirectional incompatibility in *drosophila-simulans* – inheritance, geographic-variation and fitness effects. *Genetics* **119**, 435-444.

- Hoffmann, A. A., Clancy, D. & Duncan, J. (1996).** Naturally-occurring Wolbachia infection in *Drosophila simulans* that does not cause cytoplasmic incompatibility. *Heredity (Edinb)* **76** (Pt 1), 1-8.
- Horn, M., Harzenetter, M. D., Linner, T., Schmid, E. N., Müller, K. D., Michel, R. & Wagner, M. (2001).** Members of the Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides phylum as intracellular bacteria of acanthamoebae: proposal of 'Candidatus Amoebophilus asiaticus'. *Environ Microbiol* **3**, 440-449.
- Hunter, M. S., Perlman, S. J. & Kelly, S. E. (2003).** A bacterial symbiont in the Bacteroidetes induces cytoplasmic incompatibility in the parasitoid wasp *Encarsia pergandiella*. *Proc Biol Sci* **270**, 2185-2190.
- Hurst, G., Jiggins, F., von der Schulenburg, J., Bertrand, D., West, S., Goriacheva, I., Zakharov, I., Werren, J., Stouthamer, R. & Majerus, M. (1999).** Male-killing Wolbachia in two species of insect. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* **266**, 735-740.
- Hurst, L. (1991).** The evolution of cytoplasmic incompatibility or when spite can be successful. *Journal of Theoretical Biology* **148**, 269-277.
- Ikeda, T., Ishikawa, H. & Sasaki, T. (2003).** Infection density of Wolbachia and level of cytoplasmic incompatibility in the Mediterranean flour moth, *Ephestia kuehniella*. *J Invertebr Pathol* **84**, 1-5.
- Jeyaparakash, A. & Hoy, M. (2000).** Long PCR improves Wolbachia DNA amplification: wsp sequences found in 76% of sixty-three arthropod species. *Insect Molecular Biology* **9**, 393-405.
- Jiggins, F. M., Bentley, J. K., Majerus, M. E. & Hurst, G. D. (2002).** Recent changes in phenotype and patterns of host specialization in Wolbachia bacteria. *Mol Ecol* **11**, 1275-1283.
- Johanowicz, D. & Hoy, M. (1998).** Experimental induction and termination of non-reciprocal reproductive incompatibilities in a parahaploid mite. *Entomologia Experimentalis Et Applicata* **87**, 51-58.
- Johanowicz, D. & Hoy, M. (1999).** Wolbachia infection dynamics in experimental laboratory populations of *Metaseiulus occidentalis*. *Entomologia Experimentalis Et Applicata* **93**, 259-268.
- Juchault, P., Frelon, M., Bouchon, D. & Rigaud, T. (1994).** New evidence for feminizing bacteria in terrestrial isopods – evolutionary implications. *Comptes Rendus De L Academie Des Sciences Serie Iii-Sciences De La Vie-Life Sciences* **317**, 225-230.
- Kageyama, D., Nishimura, G., Hoshizaki, S. & Ishikawa, Y. (2002).** Feminizing Wolbachia in an insect, *Ostrinia furnacalis* (Lepidoptera: Crambidae). *Heredity (Edinb)* **88**, 444-449.
- Kitajima, E. W., Groot, T. V., Novelli, V. M., Freitas-Astúa, J., Alberti, G. & de Moraes, G. J. (2007).** In situ observation of the Cardinium symbionts of *Brevipalpus* (Acari: Tenuipalpidae) by electron microscopy. *Exp Appl Acarol* **42**, 263-271.
- Kittayapong, P., Mongkalagoon, P., Baimai, V. & O'Neill, S. L. (2002).** Host age effect and expression of cytoplasmic incompatibility in field populations of Wolbachia-superinfected *Aedes albopictus*. *Heredity (Edinb)* **88**, 270-274.
- Kondrashov, A. & Kondrashov, F. (1999).** Interactions among quantitative traits in the course of sympatric speciation. *Nature* **400**, 351-354.

Kose, H. & Karr, T. L. (1995). Organization of *Wolbachia pipientis* in the *Drosophila* fertilized egg and embryo revealed by an anti-*Wolbachia* monoclonal antibody. *Mech Dev* **51**, 275-288.

Kurtti, T. J., Munderloh, U. G., Andreadis, T. G., Magnarelli, L. A. & Mather, T. N. (1996). Tick Cell Culture Isolation of an Intracellular Prokaryote from the Tick *Ixodes scapularis*. *Journal of Invertebrate Pathology* **67**, 318-321.

Lo, N., Casiraghi, M., Salati, E., Bazzocchi, C. & Bandi, C. (2002). How many *wolbachia* supergroups exist? *Mol Biol Evol* **19**, 341-346.

Lo, N., Paraskevopoulos, C., Bourtzis, K., O'Neill, S. L., Werren, J. H., Bordenstein, S. R. & Bandi, C. (2007). Taxonomic status of the intracellular bacterium *Wolbachia pipientis*. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**, 654-657.

*** Louis, C. & Nigro, L. (1989).** Ultrastructural evidence of *Wolbachia rickettsiales* in *Drosophila simulans* and their relationships with unidirectional cross-incompatibility. *Journal of invertebrate pathology* **54**, 39-44.

LuYu, Z., XinYu, J., SiXia, Y. & Min, X. (2012). Reproductive effects and localization of *Wolbachia* and *Cardinium* in the spider mite *Tetranychus piercei* (Acari: Tetranychidae). *Acta Entomologica Sinica* **55**, 684-693.

Martin, O. & Goodacre, S. (2009). Widespread infections by the bacterial endosymbiont *Cardinium* in arachnids. *Journal of Arachnology* **37**, 106-108.

Marzorati, M., Alma, A., Sacchi, L., Pajoro, M., Palermo, S., Brusetti, L., Raddadi, N., Balloi, A., Tedeschi, R., Clementi, E., Corona, S., Quaglino, F., Bianco, P. A., Beninati, T., Bandi, C., Daffonchio, D. (2006). A novel *Bacteroidetes* symbiont is localized in *Scaphoideus titanus*, the insect vector of Flavescence dorée in *Vitis vinifera*. *Appl Environ Microbiol* **72**, 1467-1475.

Marzorati, M., Pajoro, M., Clementi, E., Brusetti, L., Raddadi, N., Balloi, A., Tedeschi, R., Corona, S., Quaglino, F., Bianco, P. A., Bandi, C., Sacchi, L., Alma, A., Daffonchio, D. (2008). Characterization of the microflora associated to *Scaphoideus titanus*, the insect vector of the "flavescence dorée". *Bulletin of Insectology* **61**, 215-216.

Matalon, Y., Katzir, N., Gottlieb, Y., Portnoy, V. & Zchori-Fein, E. (2007). *Cardinium* in *Plagiomerus diaspidis* (Hymenoptera: Encyrtidae). *J Invertebr Pathol* **96**, 106-108.

McGraw, E., Merritt, D., Droller, J. & O'Neill, S. (2001). *Wolbachia*-mediated sperm modification is dependent on the host genotype in *Drosophila*. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* **268**, 2565-2570.

McGraw, E., Merritt, D., Droller, J. & O'Neill, S. (2002). *Wolbachia* density and virulence attenuation after transfer into a novel host. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 2918-2923.

Min, K. & Benzer, S. (1997). *Wolbachia*, normally a symbiont of *Drosophila*, can be virulent, causing degeneration and early death. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 10792-10796.

Moller, A., Christe, P. & Lux, E. (1999). Parasitism, host immune function, and sexual selection. *Quarterly Review of Biology* **74**, 3-20.

Nakamura, Y., Kawai, S., Yukuhiro, F., Ito, S., Gotoh, T., Kisimoto, R., Yanase, T., Matsumoto, Y., Kageyama, D. & Noda, H. (2009). Prevalence of Cardinium Bacteria in Planthoppers and Spider Mites and Taxonomic Revision of "Candidatus Cardinium hertigii" Based on Detection of a New Cardinium Group from Biting Midges. *Applied and Environmental Microbiology* **75**, 6757-6763.

* **Nelson-Rees, W. A., Hoy, M. A. & Roush, R. T. (1980).** Heterochromatinization, chromatin elimination and haploidization in the parahaploid mite *Metaseiulus occidentalis* (Nesbitt) (Acarina: Phytoseiidae). *Chromosoma* **77**, 263-276.

Noda, H., Koizumi, Y., Zhang, Q. & Deng, K. (2001). Infection density of Wolbachia and incompatibility level in two planthopper species, *Laodelphax striatellus* and *Sogatella furcifera*. *Insect Biochem Mol Biol* **31**, 727-737.

* **Norton, R. A., Kethley, J. B., Johnston, D. E., O'Connor, B. M., Wrench, D. & Ebbert, M. (1993).** Phylogenetic perspectives on genetic systems and reproductive modes of mites. *Evolution and diversity of sex ratio in insects and mites*, 8-99.

Nosil, P., Crespi, B. & Sandoval, C. (2002). Host-plant adaptation drives the parallel evolution of reproductive isolation. *Nature* **417**, 440-443.

O'Neill, S. & Karr, T. (1990). Bidirectional incompatibility between conspecific populations of *Drosophila-simulans*. *Nature* **348**, 178-180.

O'Neill, S. L., Giordano, R., Colbert, A. M., Karr, T. L. & Robertson, H. M. (1992). 16S rRNA phylogenetic analysis of the bacterial endosymbionts associated with cytoplasmic incompatibility in insects. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 2699-2702.

O'Neill, S. L., Hoffman, A. & Werren, J. H. (1997). *Influential passengers: inherited microorganisms and arthropod reproduction*: Oxford University Press.

Oh, H., Kim, M., Shin, S., Bae, K., Ahn, Y. & Park, H. (2000). Ultrastructural and molecular identification of a Wolbachia endosymbiont in a spider, *Nephila clavata*. *Insect Molecular Biology* **9**, 539-543.

Oliver, J. (1971). Parthenogenesis in mites and ticks (arachnida-acari). *American Zoologist* **11**, 283-&.

Pannebakker, B., Pijnacker, L., Zwaan, B. & Beukeboom, L. (2004). Cytology of Wolbachia-induced parthenogenesis in *Leptopilina clavipes* (Hymenoptera : Figitidae). *Genome* **47**, 299-303.

Perrot-Minnot, M., Guo, L. & Werren, J. (1996). Single and double infections with Wolbachia in the parasitic wasp *Nasonia vitripennis*: Effects on compatibility. *Genetics* **143**, 961-972.

Perrot-Minnot, M. & Werren, J. (1999). Wolbachia infection and incompatibility dynamics in experimental selection lines. *Journal of Evolutionary Biology* **12**, 272-282.

Perrot-Minnot, M., Cheval, B., Migeon, A. & Navajas, M. (2002). Contrasting effects of Wolbachia on cytoplasmic incompatibility and fecundity in the haplodiploid mite *Tetranychus urticae*. *Journal of Evolutionary Biology* **15**, 808-817.

Pijls, J., vanSteenbergen, H. & vanAlphen, J. (1996). Asexuality cured: The relations and differences between sexual and asexual *Apoanagyrus diversicornis*. *Heredity* **76**, 506-513.

Pijnacker, L., Ferwerda, M., Bolland, H. & Helle, W. (1980). Haploid female parthenogenesis in the false spider-mite *brevipalpus-obovatus* (acari, tenuipalpidae). *Genetica* **51**, 211-214.

* **Pijnacker, L., Ferwerda, M. & Helle, W. (1981).** Cytological investigations on the female and male reproductive-system of the parthenogenetic privet mite *brevipalpus-obovatus* donnadieu (phytoptipalpidae, acari). *Acarologia* **22**, 157-163.

Poinsot, D. & Mercot, H. (1997). Wolbachia infection in *Drosophila simulans*: Does the female host bear a physiological cost? *Evolution* **51**, 180-186.

Reynolds, K. T. & Hoffmann, A. A. (2002). Male age, host effects and the weak expression or nonexpression of cytoplasmic incompatibility in *Drosophila* strains infected by maternally transmitted Wolbachia. *Genetical Research* **80**, 79-87.

Riparbelli, M., Giordano, R. & Callaini, G. (2007). Effects of Wolbachia on sperm maturation and architecture in *Drosophila simulans* Riverside. *Mechanisms of Development* **124**, 699-714.

Ros, V. I. & Breeuwer, J. A. (2009). The effects of, and interactions between, *Cardinium* and Wolbachia in the doubly infected spider mite *Bryobia sarothamni*. *Heredity (Edinb)* **102**, 413-422.

Rowley, S., Raven, R. & McGraw, E. (2004). Wolbachia pipientis in Australian spiders. *Current Microbiology* **49**, 208-214.

Sacchi, L., Genchi, M., Clementi, E., Bigliardi, E., Avanzati, AM., Pajoro, M., Negri, I., Marzorati, M., Gonella, E., Alma, A., Daffonchio, D., Bandi, C. (2008). Multiple symbiosis in the leafhopper *Scaphoideus titanus* (Hemiptera: Cicadellidae): details of transovarial transmission of *Cardinium* sp. and yeast-like endosymbionts. *Tissue Cell* **40**, 231-242.

Schmitz-Esser, S., Toenshoff, E. R., Haider, S., Heinz, E., Hoenninger, V. M., Wagner, M. & Horn, M. (2008). Diversity of bacterial endosymbionts of environmental *acanthamoeba* isolates. *Appl Environ Microbiol* **74**, 5822-5831.

Stille, B. & Davring, L. (1980). Meiosis and reproductive strategy in the parthenogenetic gall wasp *diplolepis-rosae* (l) (hymenoptera, cynipidae). *Hereditas* **92**, 353-362.

Stouthamer, R. & Kazmer, D. (1994). Cytogenetics of microbe-associated parthenogenesis and its consequences for gene flow in trichogramma wasps. *Heredity* **73**, 317-327.

Stouthamer, R., Breeuwer, J. & Hurst, G. (1999). Wolbachia pipientis: Microbial manipulator of arthropod reproduction. *Annual Review of Microbiology* **53**, 71-102.

* **Tempelaar, M. (1979).** Aberrations of holokinetic chromosomes and associated lethality after x-irradiation of meiotic stages in *tetranychus-urticae koch* (acari, tetranychidae). *Mutation Research* **61**, 259-274.

Ting, C., Tsaor, S., Wu, M. & Wu, C. (1998). A rapidly evolving homeobox at the site of a hybrid sterility gene. *Science* **282**, 1501-1504.

Tram, U., Fredrick, K., Werren, J. H. & Sullivan, W. (2006). Paternal chromosome segregation during the first mitotic division determines Wolbachia-induced cytoplasmic incompatibility phenotype. *J Cell Sci* **119**, 3655-3663.

- Vala, F., Breeuwer, J. & Sabelis, M. (2000).** Wolbachia-induced 'hybrid breakdown' in the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae* Koch. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* **267**, 1931-1937.
- Vala, F., Weeks, A., Claessen, D., Breeuwer, J. & Sabelis, M. (2002).** Within- and between-population variation for Wolbachia-induced reproductive incompatibility in a haplodiploid mite. *Evolution* **56**, 1331-1339.
- Vala, F., Breeuwer, J. & Sabelis, M. (2003).** No variation for Wolbachia-induced hybrid breakdown in two populations of a spider mite. *Experimental and Applied Acarology* **29**, 1-12.
- Vala, F., Egas, M., Breeuwer, J. & Sabelis, M. (2004).** Wolbachia affects oviposition and mating behaviour of its spider mite host. *Journal of Evolutionary Biology* **17**, 692-700.
- Vavre, F., Fleury, F., Varaldi, J., Fouillet, P. & Bouletreau, M. (2000).** Evidence for female mortality in Wolbachia-mediated cytoplasmic incompatibility in haplodiploid insects: Epidemiologic and evolutionary consequences. *Evolution* **54**, 191-200.
- Vavre, F., Dedeine, F., Quillon, M., Fouillet, P., Fleury, F. & Bouletreau, M. (2001).** Within-species diversity of Wolbachia-induced cytoplasmic incompatibility in haplodiploid insects. *Evolution* **55**, 1710-1714.
- Weeks, A. & Breeuwer, J. (2001).** Wolbachia-induced parthenogenesis in a genus of phytophagous mites. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* **268**, 2245-2251.
- Weeks, A. R., Marec, F. & Breeuwer, J. A. (2001).** A mite species that consists entirely of haploid females. *Science* **292**, 2479-2482.
- Weeks, A., Reynolds, K., Hoffmann, A. & Mann, H. (2002).** Wolbachia dynamics and host effects: what has (and has not) been demonstrated? *Trends in Ecology & Evolution* **17**, 257-262.
- Weeks, A. R., Velten, R. & Stouthamer, R. (2003).** Incidence of a new sex-ratio-distorting endosymbiotic bacterium among arthropods. *Proc Biol Sci* **270**, 1857-1865.
- Weeks, A. R. & Stouthamer, R. (2004).** Increased fecundity associated with infection by a cytophaga-like intracellular bacterium in the predatory mite, *Metaseiulus occidentalis*. *Proc Biol Sci* **271 Suppl 4**, S193-195.
- Weeks, A., Turelli, M., Harcombe, W., Reynolds, K. & Hoffmann, A. (2007).** From parasite to mutualist: Rapid evolution of Wolbachia in natural populations of *Drosophila*. *Plos Biology* **5**, 997-1005.
- Werren, J. H. (1997).** Biology of Wolbachia. *Annual Review of Entomology* **42**, 587-609.
- Werren, J. H., Zhang, W. & Guo, L. R. (1995).** Evolution and phylogeny of Wolbachia: reproductive parasites of arthropods. *Proc Biol Sci* **261**, 55-63.
- Wu, K. & Hoy, M. A. (2012a).** Cardinium is associated with reproductive incompatibility in the predatory mite *Metaseiulus occidentalis* (Acari: Phytoseiidae). *J Invertebr Pathol* **110**, 359-365.
- Wu, K. & Hoy, M. A. (2012b).** Extended starvation reduced and eliminated Wolbachia, but not Cardinium, from *Metaseiulus occidentalis* females (Acari: Phytoseiidae): a need to reassess Wolbachia's status in this predatory mite? *J Invertebr Pathol* **109**, 20-26.

Xie, R. R., Zhou, L. L., Zhao, Z. J. & Hong, X. Y. (2010). Male age influences the strength of Cardinium-induced cytoplasmic incompatibility expression in the carmine spider mite *Tetranychus cinnabarinus*. *Applied Entomology and Zoology* **45**, 417-423.

Zabalou, S., Riegler, M., Theodorakopoulou, M., Stauffer, C., Savakis, C. & Bourtzis, K. (2004a). Wolbachia-induced cytoplasmic incompatibility as a means for insect pest population control. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 15042-15045.

Zabalou, S., Charlat, S., Nirgianaki, A., Lachaise, D., Mercot, H. & Bourtzis, K. (2004b). Natural wolbachia infections in the *Drosophila yakuba* species complex do not induce cytoplasmic incompatibility but fully rescue the wRi modification. *Genetics* **167**, 827-834.

Zchori-Fein, E., Roush, R. T. & Rosen, D. (1998). Distribution of parthenogenesis-inducing symbionts in ovaries and eggs of Aphytis (Hymenoptera: Aphelinidae). *Current microbiology* **36**, 1-8.

Zchori-Fein, E., Gottlieb, Y., Kelly, S. E., Brown, J. K., Wilson, J. M., Karr, T. L. & Hunter, M. S. (2001). A newly discovered bacterium associated with parthenogenesis and a change in host selection behavior in parasitoid wasps. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 12555-12560.

Zchori-Fein, E., Perlman, S. J., Kelly, S. E., Katzir, N. & Hunter, M. S. (2004). Characterization of a 'Bacteroidetes' symbiont in Encarsia wasps (Hymenoptera: Aphelinidae): proposal of 'Candidatus Cardinium hertigii'. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**, 961-968.

Zhao, D., Zhang, X. & Hong, X. (2013a). Host-Symbiont Interactions in Spider Mite *Tetranychus truncatus* Doubly Infected With Wolbachia and Cardinium. *Environmental Entomology* **42**, 445-452.

Zhao, D., Chen, D., Ge, C., Gotoh, T. & Hong, X. (2013b). Multiple Infections with Cardinium and Two Strains of Wolbachia in The Spider Mite *Tetranychus phaselus* Ehara: Revealing New Forces Driving the Spread of Wolbachia. *Plos One* **8**.

Zhou, W., Rousset, F. & O'Neil, S. (1998). Phylogeny and PCR-based classification of Wolbachia strains using wsp gene sequences. *Proc Biol Sci* **265**, 509-515.

Zhu, L., Zhang, K., Zhang, Y., Ge, C., Gotoh, T. & Hong, X. (2012). Wolbachia Strengthens Cardinium-Induced Cytoplasmic Incompatibility in the Spider Mite *Tetranychus piercei* McGregor. *Current Microbiology* **65**, 516-523.